

イネRT98型細胞質雄性不稔性および稔性回復の分子遺伝学的解析

著者	五十嵐 圭介
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17605号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00120794

イネ RT98 型細胞質雄性不稔性および稔性回復の分子遺伝学的解析

五十嵐 圭介

目次

略語一覧	1
緒言	2
第 1 章 これまでに報告された細胞質雄性不稔性の研究	5
第 1 節 CMS 遺伝子および稔性回復遺伝子	6
イネ	8
トウモロコシ	13
コムギ	16
アブラナ属作物	18
ヒマワリ	22
ソルガム	22
テンサイ	25
ペチュニア	27
インゲンマメ	27
トウガラシ	30
ニンジン	30
タバコ	32
CMS タンパク質の細胞毒性	33
CMS 遺伝子導入による不稔の誘導	33
第 2 節 雄性不稔機構	37
loss-of-function モデル	37
gain-of-function モデル	37
第 3 節 稔性回復機構	39
ゲノム制御	39
転写後制御	39
翻訳制御	40
翻訳後制御	40
代謝制御	40
第 4 節 CMS 研究における問題点の考察	41
第 2 章 RT98-CMS の稔性回復遺伝子の同定	43

第 1 節	RT98-CMS の表現型の観察	44
第 2 節	RT98-CMS に対する稔性回復遺伝子の同定	49
第 3 章	RT98-CMS の CMS 遺伝子候補の探索	63
第 1 節	RT98 型ミトコンドリアのゲノムシーケンス解析	64
第 2 節	RT98A と RT98C におけるミトコンドリア転写産物の比較	71
第 3 節	CMS 遺伝子候補 <i>orf113</i> のタンパク質解析	81
第 4 章	稔性回復遺伝子 <i>Rf98</i> と CMS 遺伝子の相互作用	87
総合考察	93
結語	98
謝辞	101
引用文献	102
補足資料	122

略語一覽

APS: ammonium peroxodisulphate

BAC: bacterial artificial chromosome

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

CDS: coding sequence

CMS: cytoplasmic male sterility

CCG: CMS-causing gene

CSPD: Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo
[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate

DAPI: 4', 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediamine-N, N, N', N',-tetraacetic acid

EtBr: ethidium bromide

InDel: insertion/deletion

IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

MTS: mitochondrial targeting signal

NBT: nitro blue tetrazolium

NGS: next generation sequencing

ORF: open reading frame

PAGE: poly-acrylamide gel electrophoresis

PCD: programmed cell death

PPR: pentatricopeptide repeat

Rf: restorer of fertility

SDS: sodium dodecyl sulfate

SSS: substoichiometric shifting

TEMED: N, N, N', N',-tetramethylenediamine

緒言

作物育種においては、雑種強勢を利用した一代雑種育種法が広まっている。一代雑種品種は雑種強勢により両親に比べ多収かつストレス耐性に優れるため、農業上有用である。イネ一代雑種品種はハイブリッドライス (hybrid rice) と呼ばれており、自殖による種子生産が行われている通常品種はインブレットライス (inbred rice) と呼ばれている。ハイブリッドライスは現在中国で最も普及しており、近年では東南アジア諸国やアメリカでのハイブリッドライス作付が増加してきている。

イネは自殖性植物であり、交雑のためには片親を雄性不稔化する必要がある。さらに、イネは種子を可食部とするため、不稔系統を用いた交雑で得られる次代では稔性が回復する必要がある。このような観点から、現在ハイブリッドライスの種子生産には細胞質雄性不稔性 (cytoplasmic male sterility: CMS) と環境感応性核遺伝子型雄性不稔性 (environment-sensitive genic male sterility: EGMS) が利用されている。EGMS は核遺伝子のみで制御されているが、CMS ではミトコンドリアの雄性不稔原因遺伝子と核の稔性回復遺伝子 (*restorer of fertility: Rf*) の相互作用により制御されている。

ハイブリッドライスの研究は中国で 1964 年から始まった。1970 年に、中国の海南島で雄性不稔性を示す野生イネが発見され、wild abortive (WA) と命名された (Shih-Cheng and Loung Ping 1980)。1972 年には WA 型細胞質を利用した CMS 系統 (WA-CMS) が育成された。1976 年から WA-CMS を利用したハイブリッドライスが商業化され、中国ではさらに 1973 年に EGMS の一種である日長・温度感応性核遺伝子型雄性不稔性 (photo-thermo sensitive genic male sterility: PTGMS) が発見されており、これを利用したハイブリッドライスは 1994 年に商業化された (Singh *et al.* 2015)。近年、中国ではハイブリッドライス作付面積がイネ作付面積全体の 50%を超えるようになった (Cheng *et al.* 2007)。そのうち、最も利用されているのが WA-CMS を利用したハイブリッドライスであるが、近年では EGMS を利用したハイブリッドライス作付面積も増加してきている (Huang *et al.* 2014)。

ハイブリッドライスの種子生産では、CMS を利用する場合は三系法、EGMS を利用する場合は二系法が用いられる。CMS を利用した三系法では、CMS 系統

に対して維持系統を交配することで CMS 系統の種子を生産する。これは、維持系統が CMS 系統と同質の核遺伝子と、その核遺伝子に対して CMS を引き起こさないミトコンドリアを保持するために稔性がある花粉を作ることができることを利用している。ハイブリッドライス種子は CMS 系統と稔性回復系統の交配により生産され、稔性回復系統の持つ稔性回復遺伝子により次代で種子を作ることができるようになる。CMS を用いた三系法では、CMS/*Rf* システムの性質上、CMS 細胞質に対して利用できる維持系統や稔性回復系統に制限があり、必ずしも雑種強勢が高い組み合わせで CMS を利用できるとは限らない。しかしながら、CMS は雄性不稔性が環境に影響されることなく非常に安定するため、ハイブリッド種子に自殖種子が混ざる可能性がないことが特徴として挙げられる。これに対し、二系法では日長感受性 GMS (photoperiod-sensitive GMS: PGMS) や温度感受性 (temperature-sensitive GMS: TGMS) が利用され、それぞれ日長条件や温度条件で不稔となる。そのため、不稔系統の種子は稔性のある条件下で自殖により生産され、維持系統を必要としない。これまでに発見された EGMS は核遺伝子の突然変異によるものであり、全て孢子体型の稔性回復様式を示している。また、花粉親には稔性回復能力が求められないため、実際には 97% の品種が花粉親に利用できるとされ、EGMS の導入も容易であることから、利用できる品種の組み合わせが CMS を利用した三系法に比べ広がった (Cao and Zhan 2014)。しかしながら、予期せぬ環境変化が不稔性に影響を与えることで自殖種子の混入によるハイブリッド種子の純度が低下する可能性があり、また PGMS を利用した二系法の運用には緯度の幅が広いことが必要となり、TGMS の場合には温度差が必要なため、赤道付近では高地の低温を利用する必要があるなどの条件が求められる。そのため、気候に左右されることなく、雑種強勢が強く出る組み合わせで安定したハイブリッドライス種子生産を行うためには、CMS 細胞質の多様化が必要である。これらの背景から CMS は農業上重要な性質であると言える。

雄性不稔性は雄性生殖器官の発達のしくみを研究する上で有用な性質であるが、CMS はそれ以外にも核とミトコンドリアの相互作用を研究するための性質としての側面を併せ持つ。ミトコンドリアはトリカルボン酸回路や電子伝達系、ATP 合成などの重要な機能を担う細胞内小器官である (Logan 2006)。ミトコン

ドリアは核とは別に独自のゲノムを保持しており、一般的に高等植物のミトコンドリアゲノムは動物に比べてサイズが大きいことが知られている。動物に比べて複雑な構造を持っている植物のミトコンドリアゲノムには、組換えによって生じたと考えられる *open reading frames (orfs)* が存在し、それらの中には、CMS を引き起こしているものもあると考えられている。また、稔性回復遺伝子 *Rf* はそれらの CMS を引き起こす遺伝子の発現を制御していると考えられている。この CMS/*Rf* システムに関する理解を深めることで、核とミトコンドリアにおける相互作用やせめぎ合い、このようなシステムを発達させてきた理由などの解明に繋がると考えられる。

本研究は、これまで分子遺伝学的に未解明である RT98 型 CMS (RT98-CMS) の稔性回復遺伝子 (*Rf98*) と、RT98型ミトコンドリアに存在する *orf* との相互作用を明らかにすることを目的とした。稔性回復系統 RT98C および CMS 系統 RT98A は、インドのアッサム地方原産の野生イネ *Oryza rufipogon* の W1109 系統を一回母本に、*O. sativa* の台中 65 号 (Taichung 65: T65) を父本として 8 回の連続戻し交雑をすることで育成された核置換系統である (Motomura *et al.* 2001)。RT98A の花粉をヨウ素ヨウ化カリウム液で染色すると、T65 や RT98C の花粉と見かけ上一致しており、花粉染色による稔・不稔個体の判定ができなかったと報告されている。また、RT98C×T65 の F₁ に T65 を戻し交雑した BC₁F₁ では稔実個体と完全不稔個体に分離し、これら 2 集団の分離比は 1:1 に適合していたため、稔性回復遺伝子は 1 座性の遺伝子であり、また RT98C×T65 の F₂ では全て稔実個体であったため、稔性は配偶体支配型であると報告されている。

本論文ではまず第 1 章でこれまでの CMS 研究をまとめ、本研究の背景を示すとともに研究の方針を示すこととする。第 2 章では花粉形態の観察から、これまでに報告されている他のイネ CMS との比較をすることで RT98-CMS の表現型を考察するとともに、RT98-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rf98* のマッピングによりクローニングした遺伝子がコードするタンパク質について機能を考察した。第 3 章では RT98 ミトコンドリアにコードされる *orf* から見出された CMS を引き起こすと考えられる遺伝子候補について考察した。第 4 章では第 2 章で同定した稔性回復遺伝子 *Rf98* と第 3 章で見出した *orf* との関係から、雄性不稔機構と稔性回復機構について考察した。

第 1 章 これまでに報告された細胞質雄性不稔性の研究

これまでに CMS は 150 以上の植物種で報告されている (Mackenzie *et al.* 1994). CMS の分子遺伝学的な報告がされてきたのは、イネ、トウモロコシ、アブラナ属、ソルガム、コムギ、インゲンマメ、トウガラシ、ニンジン、テンサイ、ペチュニア、ヒマワリである。分子遺伝学的な解析として、稔性回復遺伝子の同定、CMS を引き起こすと考えられる遺伝子の探索が多数報告されているが、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。CMS の原因となる遺伝子はミトコンドリアにコードされていると考えられているが、ミトコンドリア形質転換技術が確立されていないため、CMS の原因となる遺伝子を同定することができない。そのため、本研究では CMS を引き起こすと考えられる遺伝子を CMS-causing gene: CCG と呼び、CCG の候補となる遺伝子を CMS 遺伝子と呼ぶこととする。

この章では、これまでに報告されている CMS の報告を整理し、提唱されている分子メカニズムのモデルをまとめた。第 1 節では見出された稔性回復遺伝子および CMS 遺伝子について植物種ごとに整理した。CMS 遺伝子は相補性試験が現状不可能なため、核ゲノムへの導入試験と大腸菌や酵母を用いた細胞毒性の調査が行われている。こちらに関しては分けて記述する。第 2 節では雄性不稔機構に関する報告を整理した。第 3 節では稔性回復機構に関する報告をまとめた。第 4 節では、これまでの CMS 研究における問題点を挙げ、研究を進めるにあたり注意すべき点を考察した。

第 1 節 CMS 遺伝子および稔性回復遺伝子

表 1 にはこれまでに同定された稔性回復遺伝子およびコードするタンパク質の特徴をまとめた。表 2~12 の A には CMS 遺伝子として報告された *orf* について、隣接する遺伝子、CDS 内で相同性を示す領域とその対象、コードするタンパク質の膜貫通領域を TMHMM server v.2.0 で予測した結果をゲノム構造の特徴としてまとめた。表 2~12 の B では CMS 遺伝子について、転写産物およびタンパク質の蓄積パターンを整理した。

表 1 これまでに同定された稔性回復遺伝子

作物種	CMS 型	<i>Rf</i>	文献	アクセッション番号	特徴
イネ	BT-CMS	<i>Rf1a</i>	Kazama and Toriyama 2003,	AB106867, AB110016	P type PPR
			Akagi <i>et al.</i> 2004,	AB179840, AB112808	
			Komori <i>et al.</i> 2004	AB110443	
	HL-CMS	<i>Rf1b</i>	Wang <i>et al.</i> 2006	DQ311054	P type PPR
		<i>Rf5</i>	Hu <i>et al.</i> 2012	AB179840	P type PPR
		<i>Rf6</i>	Huang <i>et al.</i> 2015	なし	P type PPR
	LD-CMS	<i>Rf2</i>	Itabashi <i>et al.</i> 2011	AB583697	Glycine-rich protein
	WA-CMS	<i>Rf4</i>	Tang <i>et al.</i> 2014,	KJ680249	P type PPR
			Kazama and Toriyama 2014	AB900792	
トウモロコシ	CW-CMS	<i>Rf17</i>	Fujii and Toriyama 2009	AB481199	Unknown protein
	RT98-CMS	<i>Rf98</i>	Igarashi <i>et al.</i> 2016	LC131122	P type PPR
	CMS-T	<i>Rf2</i>	Cui <i>et al.</i> 1996	AAC49371	Aldehyde dehydrogenase
アブラナ	Ogura-CMS	<i>Rfo</i>	Brown <i>et al.</i> 2003	AY285674	P type PPR
	Kosena-CMS	<i>Rfk1</i>	Koizuka <i>et al.</i> 2003	AJ535623	P type PPR
ソルガム	CMS-A1	<i>Rf1</i>	Klein <i>et al.</i> 2005	AY661658	PLS type PPR
テンサイ	Owen-CMS	<i>Rf1</i>	Matsuhira <i>et al.</i> 2012	AB646135, BAM64832	Unknown protein
ペチュニア	Petunia CMS	<i>Rf-PPR592</i>	Bentolila <i>et al.</i> 2002	AY102719	P type PPR

イネ

イネでは野生イネ *Oryza rufipogon* から育成されたものとして wild abortive に由来する WA 型 CMS (WA-CMS), red-awned に由来する Hong-Lian (HL) 型 CMS (HL-CMS), Chinese wild rice strain W1 に由来する CW 型 CMS (CW-CMS), W1125 に由来する RT102 型 CMS (RT102-CMS), 本研究の RT98-CMS があり, インディカ品種から育成されたものとして, Chinsurah Boro II に由来する BT 型 CMS (BT-CMS), Lead Rice に由来する LD 型 CMS (LD-CMS) がある.

BT-CMS の CMS 遺伝子は *atp6* の下流にコードされる *orf79* が見出されている (Iwabuchi *et al.* 1993, Akagi *et al.* 1994). また, BT-CMS に対する稔性回復遺伝子は 791 アミノ酸の PPR タンパク質をコードする *Rf1a* である (Kazama and Toriyama 2003, Akagi *et al.* 2004, Komori *et al.* 2004). PPR タンパク質は 35 アミノ酸の PPR モチーフで構成されており, PPR モチーフが RNA を認識することで配列特異的に結合する RNA 結合タンパク質である (Lurin *et al.* 2004). *orf79* は *cox1* と相同性のある配列を持つキメラ構造をとっており, 稔性回復遺伝子 *Rf1a* の働きで B-*atp6-orf79* の共転写産物がプロセッシングされ, ORF79 が蓄積しなくなる (Kazama *et al.* 2008, Kazama *et al.* 2016). また, BT-CMS に対する稔性回復遺伝子として報告された *Rf1b* は, B-*atp6-orf79* mRNA の分解に関与することが示された (Wang *et al.* 2006). *orf79* のシークエンスバリエーションは HL-CMS と LD-CMS の原因遺伝子としても報告されている (Yi *et al.* 2002, Itabashi *et al.* 2009). HL-CMS の稔性回復遺伝子は *Rf5* と *Rf6* が見出されている (Huang *et al.* 2012). HL-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rf5* は *Rf1a* と同一の PPR タンパク質をコードしていた (Hu *et al.* 2012). しかし, その稔性回復機構は BT-CMS とは異なっている. BT-CMS の RF1A は B-*atp6-orf79* mRNA に直接結合してプロセッシングを行うことが示されている (Kazama *et al.* 2008). 一方, HL-CMS の RF5 は単独では *atp6-orfH79* mRNA に結合せず, グリシンリッチタンパク質 GRP162 と RF5 との複合体 (RF complex: RFC) が *atp6-orfH79* mRNA を切断することが示されている (Hu *et al.* 2012). また, ミトコンドリア移行シグナルを付加した MT-GRP162 をユビキチンプロモーターで発現誘導するコンストラクトを HL-CMS に導入すると稔性が回復し, 翻訳制御により ORFH79 が蓄積しなくなることが示された (Hu *et al.* 2013). HL-CMS の稔性回復遺伝子としてさらに

PPR タンパク質をコードする *Rf6* がクローニングされた (Huang *et al.* 2015). *RF6* も *atp6-orfH79* mRNA に直接結合できず, また GRP162 と結合しなかった. *RF6* と結合するタンパク質として Y2H により見出された OsHXK6 はヘキソキナーゼをコードしていた. そのため, HL-CMS の稔性回復機構は *Rf5* と *Rf6* でそれぞれ異なる制御機構が働いていると考えられる. LD-CMS に対する稔性回復遺伝子はグリシンリッチタンパク質をコードする *Rf2* がクローニングされた (Itabashi *et al.* 2011). LD-CMS の CMS 遺伝子は BT-CMS と似た L-*atp6-orf79* が報告されており, *Rf1* による制御も受ける (Itabashi *et al.* 2009). また, *RF2* は *atp6-orf79* mRNA の分解に関与することが示された (Kazama *et al.* 2016). さらに, *RF2* と相互作用するタンパク質として, ubiquitin domain-containing protein をコードする RIF2 が見出された (Fujii *et al.* 2014).

WA-CMS の CMS 遺伝子は 352 アミノ酸をコードする WA352 であり, 日本晴で報告されている機能未知の *orf284*, *orf224*, *orf288* と相同性のある配列を持つキメラ構造をとっていた (Luo *et al.* 2013). また, RT102-CMS の CMS 遺伝子として, WA352 と相同性のある *orf352* が見出されている (Okazaki *et al.* 2013). これらの遺伝子は下流の配列が異なっており, WA352 は下流に *nad5 exon4*, *nad5 exon5* が存在するのに対し, *orf352* は下流に *rps3* が存在している. また, WA352 はミトコンドリア電子伝達系の複合体IVのサブユニットである COX11 と結合することが示された (Luo *et al.* 2013). WA-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rf4* は PPR タンパク質をコードしており, WA352 mRNA の分解に関与していることが示された (Kazama and Toriyama 2014, Tang *et al.* 2014).

CW-CMS の CMS 遺伝子は *orf288* と相同性のある配列を持つ CW-*orf307* が見出されている (Fujii *et al.* 2010). CW-*orf307* はカルスおよび葯で発現していたが, CMS 系統と稔性回復系統で mRNA の蓄積パターンに違いは検出されなかった. また, CW-CMS の稔性回復遺伝子 *Rf17* は acyl-carrier protein synthase like domain と一部分相同な配列を持つ機能未知の ORF をコードしていた (Fujii and Toriyama 2009). *Rf17* はプロモーター領域に変異があり, 稔性回復系統では発現が低下していた. 稔性回復作用を持たないアリル (*rf17*) は細胞質に依存して発現が上昇する. そのため, *Rf17* は細胞質からのレトログレードシグナルにより制御される不稔遺伝子として RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY

(*RMS*) と命名された.

表 2 イネ CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子と</u> 隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
BT-CMS	<i>atp6-orf79</i>	AP017386	1~29	COX1	1
HL-CMS	<i>atp6-orfH79</i>	なし	1~29	COX1	1
LD-CMS	<i>atp6-orf79</i>	AP011077	1~29	COX1	1
WA-CMS	<i>rpl5-WA352</i>	JX131325	1~95	ORF284	3
			147~166	ORF224	
			168~353	ORF288	
			1~95	ORF284	
RT102-CMS	<i>rpl5-orf352</i>	AP012528	147~166	ORF224	3
			168~353	ORF288	
CW-CMS	<i>CW-orf307</i>	AP011076	31~135	ORF288	0

表 2 続き

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量	ORF タンパク質の蓄積
BT-CMS	<i>orf79</i>	<i>Rf1a</i> 導入で切断 (Kazama <i>et al.</i> 2008)	<i>Rf1a</i> 導入により蓄積減少 (Kazama <i>et al.</i> 2008) <i>Rf2</i> 導入により蓄積減少 (Kazama <i>et al.</i> 2016)
		<i>Rf1b</i> 導入で分解 (Wang <i>et al.</i> 2006)	
		<i>Rf2</i> 導入で分解 (Kazama <i>et al.</i> 2016)	
HL-CMS	<i>orfH79</i>	<i>Rf5</i> 導入で切断 (Hu <i>et al.</i> 2012)	CMS 系統で蓄積検出 (Wang <i>et al.</i> 2013)
		<i>Rf6</i> 導入で切断 (Huang <i>et al.</i> 2015)	<i>Rf6</i> 導入で蓄積減少 (Huang <i>et al.</i> 2015)
LD-CMS	<i>orf79</i>	<i>Rf1a</i> 系統で切断 (Itabashi <i>et al.</i> 2009)	<i>Rf2</i> 導入で蓄積減少 (Kazama <i>et al.</i> 2016)
		<i>Rf2</i> 導入で分解 (Kazama <i>et al.</i> 2016)	
WA-CMS	WA352	<i>Rf4</i> 系統で切断, <i>Rf3</i> 系統で分解 (Luo <i>et al.</i> 2013)	<i>Rf4</i> 系統, <i>Rf3</i> 系統で蓄積減少 (Luo <i>et al.</i> 2013)
		<i>Rf4</i> 導入で分解 (Kazama and Toriyama 2014)	
RT102-CMS	<i>orf352</i>	稔性回復系統で切断 (Okazaki <i>et al.</i> 2013)	報告なし
CW-CMS	<i>CW-orf307</i>	蓄積差なし (Fujii <i>et al.</i> 2010)	報告なし

トウモロコシ

トウモロコシ (*Zea mays*) では, CMS-Texas (CMS-T), CMS-USDA (CMS-S), CMS-Charrua (CMS-C) で CMS 遺伝子が見出されている. 3 種の CMS とそれぞれの稔性回復系統のシュートから単離したミトコンドリアには特異的に蓄積するタンパク質が見出されている (Forde and Leaver 1980). そのうち, CMS-T については CMS 系統でのみ蓄積する 13 kDa のタンパク質が見出されている. その後, CMS-T に特異的に存在する *urf13* が見出され, *urf13* は下流の *orf25 (atp4)* と共転写されており, CMS 系統と稔性回復系統では mRNA の蓄積パターンが異なっていることがわかった (Dewey *et al.* 1986). *urf13* は 26S rRNA をコードする *rrn26* の 3'隣接領域およびコーディング領域と相同性の高い配列を保持するキメラ構造をとっている (Levings III and Charles S 1990). これまでに, CMS-T に対する稔性回復遺伝子は *Rf1*, *Rf2*, *Rf8*, *Rf**が見出されており *Rf1*, *Rf8*, *Rf**は *urf13-atp4* の mRNA の切断に関与し, URF13 の蓄積量を稔性回復系統で減少させる働きがあるが, *Rf2* は *urf13-atp4* の mRNA の蓄積パターンや URF13 の蓄積に影響しない (Dewey *et al.* 1987, Dill *et al.* 1997, Wise *et al.* 1999). そのため, RF2 は URF13 の翻訳後制御に関与することが示唆された. トランスポゾンタギングにより *Rf2* がクローニングされ, *Rf2* はアルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase: ALDH) をコードしていることが明らかとなった (Cui *et al.* 1996). RF2 はタペート組織に蓄積し, ミトコンドリアに局在して ALDH 活性を示す (Liu *et al.* 2001). しかしながら, どのようにして URF13 の翻訳後制御をしているかは明らかとなっていない. *Rf2* は *urf13-atp4* を持たない正常型細胞質においても葯の正常な発達に必要であるとされる (Liu *et al.* 2001). また, *Rf1* や *Rf8* による CMS-T の稔性回復には *Rf2* が必要である (Dill *et al.* 1997). これらの報告からは, RF2 が URF13 を特異的に制御しているとは言えない. そのため, CMS-T の CMS 遺伝子 *urf13* は *Rf1*, *Rf8*, *Rf**のプロセッシングによる制御を受けていると考えられる.

CMS-S に特異的に存在する R 配列には *orf355-orf77* が見出されており, *orf77* は *atp9* および *orf221* と相同性の高い配列を持つキメラ構造をとっていた (Zabala *et al.* 1997). *orf355-orf77* は葉で発現せずに花粉でのみ発現しており, 2.8 kb と 1.6 kb の mRNA が検出された (Wen and Chase 1999). CMS-S に対する稔性

回復遺伝子は *Rf3* と *Rf9* が見出されており, *Rf3* は 2.6 kb と 1.6 kb の mRNA の分解, *Rf9* は 1.6 kb の mRNA の分解に作用し, 稔性回復能力は *Rf3* よりも *Rf9* が低い (Gabay-Laughnan *et al.* 2009). また, CMS 系統より見出されている稔性が高い稔性復帰変異体では 1.6 kb の mRNA の蓄積量が少なくなる (Matera *et al.* 2011). キメラ構造を持つと報告されているのは *orf77* であるが, 1.6 kb の転写産物の 3'末端は *orf77* の CDS の内部に存在しているため, *orf355* が CMS 遺伝子と考えられる (Xiao *et al.* 2006).

CMS-C ではこれまでのところ, 正常型細胞質や CMS-T, CMS-S には存在していない *atp6-c* が見出されており, *atp6-c* は *atp9* および *atp6* と相同性の高い配列を持つキメラ構造をとっており, 実生での発現が検出されている (Dewey *et al.* 1991).

表 3 トウモロコシ CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
CMS-T	<u>urf13-atp4</u>	DQ490953	1~264 (塩基基準) 297~345 (塩基基準)	<i>rrn26</i> 3' flank <i>rrn26</i>	1
CMS-S	<u>orf355</u>	DQ490951	なし	なし	1
CMS-C	<u>atp6-C</u>	DQ645536	1~13 162~428	ATP9 ATP6	5

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
CMS-T	<i>urf13</i>	<i>Rf1</i> 系統で切断, <i>Rf2</i> 系統で蓄積差なし (Dewey <i>et al.</i> 1987) <i>Rf8</i> 系統で切断, <i>Rf*</i> 系統で切断 (Wise <i>et al.</i> 1999)	<i>Rf1</i> 系統で蓄積減少, <i>Rf2</i> 系統で蓄積差なし (Dewey <i>et al.</i> 1987)
CMS-S	<i>orf355</i>	<i>Rf9</i> 系統で一部分解, <i>Rf3</i> 系統で分解 (Gabay-Laughnan <i>et al.</i> 2009)	報告なし
CMS-C	<i>atp6-C</i>	CMS 系統で蓄積あり (Dewey <i>et al.</i> 1991)	報告なし

コムギ

Triticum timopheevi に由来する CMS において, CMS 遺伝子として下流の *cox1* と共転写される *orf256* が見出され, CMS 系統でのみ ORF256 の蓄積が検出された (Rathburn and Hedgcoth 1991, Song and Hedgcoth 1994, Hedgcoth *et al.* 2002). *orf256* の N 末端の 11 アミノ酸は *cox1* と一致していた.

Aegilops crassa 細胞質を持つ CMS では, 日長感応性細胞質雄性不稔性 (photoperiod sensitive cytoplasmic male sterility: PCMS) が示されており, 長日条件で発現する *orf260^{cra}* が CMS 遺伝子と考えられている (Zhu *et al.* 2008).

表 4 コムギ CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	CMS 遺伝子と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
<i>Triticum timopheevi</i> CMS	<i>orf256-cox1</i>	X56186	1~11	COX1	1
<i>Aegilops crassa</i> PCMS	<i>orf260^{cra}-cox1</i>	AB438956	なし	なし	1

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	orf mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
<i>Triticum timopheevi</i> CMS	<i>orf256</i>	RT-PCR により CMS 系統で発現検出 (Hedgcoth <i>et al.</i> 2002)	稔性回復系統で蓄積減少 (Song and Hedgcoth 1994)
<i>Aegilops crassa</i> PCMS	<i>orf260^{cra}</i>	RT-PCR により発現差検出 (Zhu <i>et al.</i> 2008)	長日条件で蓄積増加 (Zhu <i>et al.</i> 2008)

アブラナ属作物

Ogura-CMS で特異的に見られる *orf138* は、下流に *orfB (atp4)* が存在していた (Bonhomme *et al.* 1992, Krishnasamy and Makaroff 1993). *orf138* は既知の遺伝子とのキメラ構造は見られない. *orf138* は花で発現していたが、CMS 系統と稔性回復系統で mRNA の蓄積パターンに違いが見られなかった (Krishnasamy and Makaroff 1993). しかし、ORF138 は稔性回復系統では蓄積しておらず、CMS 系統のミトコンドリアの膜画分に蓄積していた (Grelon *et al.* 1994, Krishnasamy and Makaroff 1994). Ogura-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rfo* は P タイプの PPR タンパク質をコードしていた (Brown *et al.* 2003, Desloire *et al.* 2003). *Rfo* 導入により稔性が回復した個体では ORF138 の蓄積量が減少していた (Uyttewaal *et al.* 2008). このことから、Ogura-CMS の稔性回復遺伝子 *Rfo* は *orf138* の翻訳制御に作用することがわかった.

Kosena-CMS の CMS 遺伝子として Ogura-CMS の *orf138* と高い相同性のある配列を持つ *orf125* が見出されている (Iwabuchi *et al.* 1999). Ogura-CMS 同様、*orf125* の mRNA は CMS 系統と稔性回復系統で蓄積パターンに違いは無い. また、クローニングされた稔性回復遺伝子 *Rfk1* の塩基配列は Ogura-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rfo* と完全に一致しており、機能も翻訳制御による ORF125 の蓄積量の減少であった (Koizuka *et al.* 2003).

Polima-CMS では CMS 遺伝子として *atp8* とのキメラ構造を持つ *orf224* が見出されており、花で 2.2 kb と 1.9 kb の mRNA が発現している (Singh and Brown 1991, Menassa *et al.* 1999). この 2.2 kb と 1.9 kb の mRNA は *orf224* の下流にある *atp6* と共転写されており、稔性回復系統ではプロセッシングを受けていた.

Napus-CMS では、Polima-CMS 同様に *atp8* とのキメラ構造を持ち、*orf224* と相同性の高い *orf222* が CMS 遺伝子として見出されており、*nad5c* と共転写されている (L'Homme *et al.* 1997, Brown 1999). しかしながら、それぞれの稔性回復遺伝子 *Rfn* と *Rfp* はお互いを相補しない. また、*Rfn* と *Rfp* は RNA プロセッシングに関与していると考えられる.

Tournefortii-CMS で見出された CMS 遺伝子 *orf263* は、*R. sativus* の Tokumaru 細胞質が保持する *atp9* と相同性の高い配列を持つキメラ遺伝子であり、*atp6* と共転写されており、CMS 系統と稔性回復系統で mRNA の蓄積パターンに違いは

検出されなかった (Landgren *et al.* 1996). この *orf263* と相同性の高い *orf288* が Hau-CMS の CMS 遺伝子として見出された (Jing *et al.* 2011). *orf288* の mRNA は稔性回復系統では分解されており, 実生において CMS 系統でのみ ORF288 の蓄積が検出された. また, *orf288* は *nad5* と *orf293* のキメラ構造を持つとも報告されている (Heng *et al.* 2014).

Tuber mustard CMS からは *atpA*, *orf220*, *orf256*, *orf305* が CMS 遺伝子の候補として見出されている (Yu *et al.* 2010). そのうち, MTS を付加した *orf220* を恒常的高発現プロモーターで誘導すると不稔となった (Yang *et al.* 2010).

Dongbu 細胞質を持つ DCGMS では, *cox1* と相同性のある配列を持つ *orf463* が CMS 遺伝子として報告された (Park *et al.* 2013). *orf463* は 12 個の膜貫通ドメインを持つタンパク質をコードしていた.

Diplotaxis muralis に由来する細胞質を持つ CMS/D. m. では, *rps7* の下流に *atp9* とキメラ構造をとる *orf72* が CMS 遺伝子として見出された (Shinada *et al.* 2006). *orf72* は mRNA の蓄積パターンが稔性回復系統で変化しないため, 翻訳制御または翻訳後制御を受けていると考えられている.

表 5 アブラナ属 CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
Ogura-CMS	<u>orf138-<i>atp8</i></u>	Z12626	なし	なし	1
Kosena-CMS	<u>orf125-<i>atp8</i></u>	AB015327	なし	なし	1
Polima-CMS	<u>orf224-<i>atp6</i></u>	FR715249	1~58	ATP8	2
Napus-CMS	<u>orf222-<i>nad5_ex3</i></u>	U10423	1~58	ATP8	2
Tournefortii-CMS	<i>atp6</i> - <u>orf263</u>	X83692	139~238	ATP9	3
Hau-CMS	<i>atp6</i> - <u>orf288</u>	KF736092	8~38	NAD5	3
			39~288	ORF293	
Tuber mustard CMS	<u>orf220</u>	AY208898	なし	なし	2
DCGMS	<u>orf463</u>	KC193578	1~42	COX1	12
CMS/D. m.	<i>rps7</i> - <u>orf72</u>	AB243571	1~11	ORF188	2
			14~23	ATP9	

表 5 続き

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
Ogura-CMS	<i>orf138</i>	蓄積差なし (Krishnasamy and Makaroff 1993)	<i>Rfo</i> 導入で蓄積減少 (Uyttewaal <i>et al.</i> 2008)
Kosena-CMS	<i>orf125</i>	蓄積差なし (Iwabuchi <i>et al.</i> 1999)	<i>Rfk1</i> 導入で蓄積減少 (Koizuka <i>et al.</i> 2003)
Polima-CMS	<i>orf224</i>	<i>Rfp</i> 系統で切断 (Singh and Brown 1991, Menassa <i>et al.</i> 1999)	報告なし
Napus-CMS	<i>orf222</i>	稔性回復系統で切断 (L'Homme <i>et al.</i> 1997, Brown 1999)	報告なし
Tournefortii-CMS	<i>orf263</i>	蓄積差なし (Landgren <i>et al.</i> 1996)	報告なし
Hau-CMS	<i>orf288</i>	稔性回復系統で分解 (Jing <i>et al.</i> 2011)	稔性回復系統で蓄積減少 (Jing <i>et al.</i> 2011)
Tuber mustard CMS	<i>orf220</i>	RT-PCR により CMS 系統で発現検出 (Yu <i>et al.</i> 2010)	報告なし
DCGMS	<i>orf463</i>	報告なし	報告なし
CMS/D. m.	<i>orf72</i>	蓄積差なし (Shinada <i>et al.</i> 2006)	報告なし

ヒマワリ

ヒマワリ (*Helianthus annuus*) の CMS 遺伝子は, *Helianthus petiolaris* に由来する CMS-PEP1 で見出された *orfH522* である (Horn *et al.* 1991, Köhler *et al.* 1991, Laver *et al.* 1991). *orfH522* は上流の *atpA* (*atp1*) と共転写されており, 約 16 kDa のタンパク質をコードしている. また, ヒマワリで見出されている CMS の多くで ORFH522 に似たタンパク質が蓄積している (Horn *et al.* 1996). *orfH522* は *orfB* (*atp8*) と相同性のある配列を持つキメラ構造をとっており, 膜貫通領域をコードする. *atp1-orfH522* は雄性生殖器官において *atp1* の上流から転写される 3 kb の共転写産物が回復系統やハイブリッド系統では減少しており, それに伴い ORFH522 の蓄積が減少している (Moneger *et al.* 1994).

ソルガム

ソルガムの CMS では, A1 細胞質を持つ CMS 系統 (CMS-A1) に対する稔性回復遺伝子として *Rf1* と *Rf2* が見出されており, マッピングと細胞内局在予測から見出された *PPR13* が *Rf1* であると報告されている (Klein *et al.* 2005, Jordan *et al.* 2010). CMS-A1 の CMS 遺伝子は不明であるが, *Rf1* が PLS タイプの PPR 遺伝子であったため, RNA 編集に関与すると考えられる.

A3 細胞質を持つ CMS-A3 において CMS 遺伝子 *orf107* が見出されている (Tang *et al.* 1996). *orf107* は *atp9* とイネ BT-CMS の CMS 遺伝子 *orf79* と相同性が高い配列を持つキメラ構造をとっている. *orf107* は稔性回復系統で 2 箇所の RNA 編集が起きており, また mRNA の切断が起きていた (Tang *et al.* 1999). 筆者達は RNA 編集により mRNA の切断が促進されると考察している.

表 6 ヒマワリ CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
CMS-PET1	<i>atp1-orfH522</i>	X55963	1~19	ATP8	1

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
CMS-PET1	<i>orfH522</i>	稔性回復系統で分解 (Moneger <i>et al.</i> 1994)	稔性回復系統で蓄積減少 (Moneger <i>et al.</i> 1994)

表 7 ソルガム CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
CMS-A3	<u>orf107</u>	U38309	1~31 59~107	ATP9 ORF79	2

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	orf mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
CMS-A3	orf107	Rf3 系統で切断 (Tang <i>et al.</i> 1999)	報告なし

テンサイ

Owen-CMS に対する稔性回復遺伝子として、稔性回復系統 NK-198 が持つ *Rf1* 遺伝子がクローニングされた (Matsuhira *et al.* 2012). *Rf1* がコードするタンパク質はミトコンドリアに局在し、Yeast でミトコンドリア膜タンパク質の品質をコントロールしている M48 ペプチダーゼをコードする *Oma1* と塩基配列の相同性が高かったが、 Zn^{2+} 結合モチーフを持たないため、プロテアーゼ活性は失われていると考えられた。そのため、*Rf1* の機能は不明である。*Rf1* は稔性回復能力が低かったが、*Rf1* 導入個体の稔性は CMS 系統に NK-198 を交雑した後代と同程度であったため、*Rf1* の稔性回復能力が低いことには矛盾しないことが示された。Owen-CMS の CMS 遺伝子 *preSatzp6* は *atp6* の 5'側が組換わっており、通常よりも N 末端側に伸びた 39 kDa のタンパク質を蓄積する (Yamamoto *et al.* 2005)。この *preSATP6* は膜タンパク質であり、稔性回復遺伝子 *Rf1* から翻訳される bvORF20 タンパク質との結合が示された (Kitazaki *et al.* 2015)。CMS 系統では *preSATP6* のホモオリゴマーと考えられる 250 kDa の複合体が形成されていたが、bvORF20 は *preSATP6* と結合して 200 kDa の複合体となるため、bvORF20 は翻訳後制御により CMS 遺伝子を制御していると考えられた。そのため、Owen-CMS では *preSATP6* のオリゴマーによる pore の形成が CMS の原因ではないかと考えられた。

wild beets 由来の細胞質を持つ CMS 系統 I-12 CMS(3) では CMS 遺伝子として *orf129* が見出された (Yamamoto *et al.* 2008)。ORF129 は稔性回復系統との交雑後代においても蓄積していたため、翻訳後制御を受けていることが示唆されている。

G 細胞質を持つ GCMS には変異が入ることにより C 末端側が 8 アミノ酸短くなった *cox2* (*G cox2*) が存在し、シトクロム c オキシダーゼ活性が通常細胞質を持つ系統に比べて 50% に低下していた (Ducos *et al.* 2001)。このことから、GCMS は loss-of-function による変異体と考えられている。

表 8 テンサイ CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
Owen-CMS	<i>preSatp6</i>	BA000024	388~639	ATP6	16
I-12CMS(3)	<i>orf129</i>	AB355937	1~12	COX2	1
GCMS	<i>G cox2</i>	AF276430	なし	なし	2

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
Owen-CMS	<i>preSatp6</i>	CMS 系統で蓄積あり (Onodera <i>et al.</i> 1999, Satoh <i>et al.</i> 2004)	蓄積差なし, RF1 (bvORF20) との相互作用あり (Kitazaki <i>et al.</i> 2015)
I-12CMS(3)	<i>orf129</i>	F1 系統で蓄積差なし (Yamamoto <i>et al.</i> 2008)	蓄積差なし (Yamamoto <i>et al.</i> 2008)
GCMS	<i>G cox2</i>	CMS 系統で蓄積あり (Ducos <i>et al.</i> 2001)	CMS 系統で蓄積検出 (Ducos <i>et al.</i> 2001)

ペチュニア

ペチュニアでは, *petunia fused gene (pcf)* が CMS 遺伝子として見出されている (Nivison and Hanson 1989). *pcf* は *atp9*, *cox2-1* とのキメラ構造を持っており, 稔性回復遺伝子 *Rf* により mRNA の蓄積パターンが変化した (Pruitt and Hanson 1991, Hanson *et al.* 1999). さらに, PCF の蓄積が稔性回復系統で減少していた (Nivison and Hanson 1989). クローニングされた *Rf* は P タイプの PPR タンパク質をコードする *Rf-PPR592* であり, *Rf-PPR592* を導入した個体では PCF の蓄積量が低下していた (Bentolila *et al.* 2002).

インゲンマメ

インゲンマメの CMS (CMS-Sprite) には *phaseolus vulgaris sterility sequence (pvs)* が特異的配列として見出されており, この領域には *pvsORF1 (orf98)* と *pvsORF2 (orf239)* が予測された (Johns *et al.* 1992). このうち, ORF239 は CMS 系統の雄性生殖器官での蓄積が確認された (Abad *et al.* 1995). CMS-Sprite の稔性回復遺伝子 *Fr* は SSS によって *pvs* 領域のコピー数を減少させることで稔性を回復している (Mackenzie and Chase 1990, Janska *et al.* 1998).

表 9 ペチュニア CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
Petunia CMS	<i>pcf-nad3-rps12</i>	M16770	1~8 9~107	ATP9 COX2	3

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
Petunia CMS	<i>pcf</i>	稔性回復系統で切断または分解 (Pruitt and Hanson 1991, Hanson <i>et al.</i> 1999)	<i>Rf-PPR592</i> 導入で蓄積減少 (Bentolila <i>et al.</i> 2002)

表 10 インゲンマメ CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
CMS-Sprite	<i>orf98-<u>orf239</u></i>	M87062	なし	なし	1

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> が存在するゲノム領域の存在量の調査と <i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
CMS-Sprite	<i>orf239</i>	<i>Fr</i> 系統でコピー数減少 (Mackenzie and Chase 1990) <i>Fr</i> 系統で蓄積減少 (Mackenzie and Chase 1990)	<i>Fr</i> 系統で蓄積減少 (Abad <i>et al.</i> 1995)

トウガラシ

Chili pepper CMS では CMS 遺伝子として *orf456* が見出された (Kim *et al.* 2007). 当初は 456 bp の *orf* としての報告だったが、その後シーケンスのミスが発覚し、実際には 507 bp の *orf* (*orf507*) であったと報告された (Gulyas *et al.* 2010). *orf507* は上流の *cox2* と共転写されており、稔性回復系統では mRNA が分解され、ORF507 の蓄積が無くなる。さらに、ORF507 の N 末端配列は ATP6 と相互作用し、complex V の活性を低下させることが示された (Li *et al.* 2013). また、Chili pepper CMS のミトコンドリアには、*atp6* が 2 コピー存在しており、3'側が組換わった Ψ *atp6-2* と正常型の *atp6-1* から転写される mRNA を CMS 系統と稔性回復系統で比較すると、CMS 系統で Ψ *atp6-2* の mRNA が増加し、*atp6-1* の mRNA が減少していた (Kim and Kim 2006). Ψ *atp6-2* の発現と ATPase 活性に相関があったことから、 Ψ *atp6-2* も CMS 遺伝子の候補として考えられた (Ji *et al.* 2013).

ニンジン

ニンジンの petaloid CMS では、*orfB* の下流に由来不明の配列を持つ *orfB-CMS* が CMS 遺伝子として見出されている (Nakajima *et al.* 2001). *orfB-CMS* は葉と花で発現しており、稔性回復系統との交雑後代では *orfB-CMS* mRNA がプロセッシングを受ける。発現は葉でも見られるが、ORFB-CMS の蓄積が検出できたのは花のみである。

表 11 トウガラシ CMS における報告

(A) CMS 遺伝子のゲノム構造の特徴

CMS 型	<u>CMS 遺伝子</u> と隣接する遺伝子	アクセッション番号	相同性を示す領域 (アミノ酸基準)	相同性を示す対象	膜貫通領域数
Chili pepper CMS	<i>cox2-orf507</i>	FJ175153	なし	なし	1
	<i>Ψatp6-2</i>	KJ865409	1~310	ATP6	2

(B) CMS 遺伝子研究の進捗

CMS 型	CMS 遺伝子	<i>orf</i> mRNA の蓄積パターンまたは蓄積量の調査	ORF タンパク質の蓄積調査
Chili pepper CMS	<i>orf507</i>	稔性回復系統で分解 (Kim <i>et al.</i> 2007)	稔性回復系統で蓄積減少 (Kim <i>et al.</i> 2007)
	<i>Ψatp6-2</i>	蓄積差あり (Kim and Kim 2006)	報告なし

タバコ

タバコでは, *Nicotiana sylvestris* のプロトプラストから再生した変異体 CMSI と CMSII が見出されている. CMSI では *nad7* のエキソン 3 とエキソン 4 を含む領域が欠損している (Gutierrez *et al.* 1997). また, CMSII では *nad7* に加えて *nad1* のエキソン 1 をコードする領域に欠損があった (Lelandais *et al.* 1998, Gutierrez *et al.* 1999). CMSI と CMSII は不稔のほか, 生育不良が見られ, 花器官が小さくなり, また夏には稔実率は低いが稔性があった (Gutierrez *et al.* 1997).

CMS タンパク質の細胞毒性

CMS 遺伝子にコードされるタンパク質を大腸菌や酵母で発現させると、細胞毒性が現れることが多数報告されている。これまでに、CMS 遺伝子が大腸菌で発現誘導した場合に毒性が示されたのは、イネ BT-CMS の *orf79* (Wang *et al.* 2006)、ヒマワリ CMS-PET1 の *orfH522* (Nakai *et al.* 1995)、アブラナ Ogura-CMS の *orf138* (Duroc *et al.* 2005)、Hau-CMS の *orf288* (Jing *et al.* 2011)、トウガラシ CMS-Peterson の *orf507* (Li *et al.* 2013) である。また、イネ HL-CMS の *orfH79* は酵母で発現を誘導した場合に毒性を示した (Peng *et al.* 2009)。

CMS 遺伝子導入による不稔の誘導

ミトコンドリアの形質転換法は確立されていないため、見出した CMS 遺伝子が本当に CMS の原因かどうかを推定するために、ミトコンドリア移行シグナルを付加した CMS 遺伝子を核ゲノムに導入する手法が用いられてきた。表 12 には、これまでの CMS 遺伝子の遺伝子導入についての報告を、用いられたプロモーター、MTS、導入対象についてまとめた。CMS 遺伝子に付加する MTS は限定されておらず、誘導プロモーターは大きく恒常的高発現プロモーターと花芽特異的プロモーターに大別される。以下には、これまでの報告に用いられたプロモーター、MTS、CMS 遺伝子、導入対象についてまとめた。CMS 遺伝子に MTS を付加することにより不稔を示すのは *WA352*, *orfH522*, *orf220* であり、*orfH522* は *CaMV35S* プロモーターで誘導しても不稔を示さない (Nizampatnam *et al.* 2009, Yang *et al.* 2010, Luo *et al.* 2013)。CMS 遺伝子に MTS を付加しなくても不稔を示すのは、*orf288*, *orf239*, *orf456*, *orf129* である (He *et al.* 1996, Kim *et al.* 2007, Yamamoto *et al.* 2008, Jing *et al.* 2011)。また、核に導入しても不稔を示さないのは *urf13*, *orf138* である (Chaumont *et al.* 1995, Duroc *et al.* 2006)。*orf79* は *CaMV35S* プロモーターで誘導した場合のみ不稔を示し、*Ubiquitin* プロモーターで誘導する場合には γ ATPase を MTS として付加すると形質転換後の再分化個体を得られない (Wang *et al.* 2006, Kojima *et al.* 2010)。一方で、*orfH79* は *Ubiquitin* プロモーターで誘導すると部分不稔となる (Peng *et al.* 2010)。誘導するプロモーターや MTS、導入対象によっては必ずしも不稔を誘導するとは限らないため、CMS 遺伝子導入実験の結果から CMS の雄性不稔機構について考察す

る際は注意すべきである.

表 12 CMS 遺伝子導入試験の報告

作物種	CMS 系統	プロモーター	MTS	CMS 遺伝子	導入対象	表現型	文献
イネ	BT-CMS	<i>CaMV35S</i>	<i>Rf1b</i>	<i>orf79</i>	Rice	semi-sterile	Wang <i>et al.</i> 2006
		<i>Maize Ubiquitin</i>	<i>Rf1a</i>	<i>orf79</i>	Rice	male fertile	
	BT-CMS	<i>Maize Ubiquitin</i>		<i>orf79</i>	Rice	male fertile	Kojima <i>et al.</i> 2010
		<i>Maize Ubiquitin</i>	ATPase γ subunit (γ ATPase) of <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>orf79</i>	Rice	not regenerated	
	HL-CMS	<i>Maize Ubiquitin</i>	<i>Rfo</i>	<i>orfH79</i>	Rice	semi-sterile	Peng <i>et al.</i> 2010
		<i>CaMV35S</i>	<i>Rf1b</i>	WA352	Rice	male sterile	
		<i>CaMV35S</i>	<i>Rf1b</i>	GFP-WA352	Rice	male sterile	
	WA-CMS	<i>CaMV35S</i>		WA352	Rice	male fertile	Luo <i>et al.</i> 2013
		<i>CaMV35S</i>	<i>Rf1b</i>	WA352	<i>Arabidopsis</i>	male sterile	
		<i>CaMV35S</i>		WA352	<i>Arabidopsis</i>	male fertile	
トウモロコシ	CMS-T	<i>CaMV35S</i>	β subunit of <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> ATPase	<i>urf13</i>	Tobacco	male fertile	Chaumont <i>et al.</i> 1995
		<i>CaMV35S</i>		<i>urf13</i>	Tobacco	male fertile	
	Ogura-CMS	<i>A9</i>	β subunit of <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> ATPase	<i>orf138</i>	<i>Arabidopsis</i>	male fertile	Duroc <i>et al.</i> 2006
		<i>CaMV35S</i>	β subunit of <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> ATPase	<i>orf138</i>	<i>Arabidopsis</i>	male fertile	
		<i>CaMV35S</i>	<i>coxIV</i>	<i>orf288</i>	<i>Arabidopsis</i>	male fertile	
アブラナ	Hau-CMS	<i>AP3</i>	<i>coxIV</i>	<i>orf288</i>	<i>Arabidopsis</i>	male sterile	Jing <i>et al.</i> 2011
		<i>AP3</i>		<i>orf288</i>	<i>Arabidopsis</i>	male sterile	
	Tuber mustard CMS	<i>CaMV35S</i>	β subunit of <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> ATPase	<i>orf220-GFP</i>	<i>Brassica juncea</i>	male sterile	Yang <i>et al.</i> 2010
		<i>CaMV35S</i>		<i>orf220-GFP</i>	<i>Brassica juncea</i>	male fertile	

表 12 続き

作物種	CMS 系統	プロモーター	MTS	CMS 遺伝子	導入対象	表現型	文献
ヒマワリ	CMS-PET1	<i>TA29</i>	<i>coxIV</i>	<i>orfH522</i>	Tobacco	semi-sterile	Nizampatnam <i>et al.</i> 2009
		<i>TA29</i>		<i>orfH522</i>	Tobacco	male fertile	
		<i>CaMV35S</i>	<i>coxIV</i>	<i>orfH522</i>	Tobacco	male fertile	
		<i>CaMV35S</i>		<i>orfH522</i>	Tobacco	male fertile	
テンサイ	I-12 CMS(3)	<i>AP3</i>	sugar beet pyruvate dehydrogenase PDHE1 α subunit	<i>orf129</i>	<i>Arabidopsis</i>	semi-sterile	Yamamoto <i>et al.</i> 2008
		<i>AP3</i>		<i>orf129</i>	<i>Arabidopsis</i>	semi-sterile	
		<i>Lat52</i>	β subunit of <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> ATPase	<i>orf239</i>	Tobacco	semi-sterile	
インゲンマメ	CMS-Sprite	<i>Lat52</i>		<i>orf239</i>	Tobacco	semi-sterile	He <i>et al.</i> 1996
		<i>SP</i>	β subunit of <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> ATPase	<i>orf239</i>	Tobacco	semi-sterile	
		<i>SP</i>		<i>orf239</i>	Tobacco	semi-sterile	
		<i>SP</i>		<i>orf239</i>	Tobacco	semi-sterile	
トウガラシ	Chili pepper CMS	<i>CaMV35S</i>	<i>coxIV</i>	<i>orf456</i>	<i>Arabidopsis</i>	semi-sterile	Kim <i>et al.</i> 2007
		<i>CaMV35S</i>		<i>orf456</i>	<i>Arabidopsis</i>	semi-sterile	

第 2 節 雄性不稔機構

CMS 遺伝子は通常細胞質には存在しない配列から見出されてきた。植物ミトコンドリアでは重複配列を介した組換えによりサブゲノム分子が形成されており，そこから見出された新規 *orf* には CMS 遺伝子となる *orf* が含まれていると考えられる (Mackenzie and McIntosh 1999). 新たに獲得した *orf* が CMS を引き起こす場合は *gain-of-function* と呼ばれており，対して既存のミトコンドリアの呼吸鎖をコードする遺伝子に変異が生じた場合は *loss-of-function* と呼ばれている (Chase 2007).

loss-of-function モデル

loss-of-function の例としては，先に挙げたテンサイ GCMS，タバコの CMSI, CMSIIが挙げられる。

GCMS では *cox2* および *nad9* の内部で組換えが生じており，正常細胞質とは異なる大きさのタンパク質が蓄積している。複合体の活性が低下していたのは complex IVのみであり，complex Iでは低下していなかった (Ducos *et al.* 2001).

CMSIでは *nad7*, CMSIIではさらに *nad1* のコード領域に欠失があり，それぞれの CMS で complex Iの活性が低下していた (Gutierrez *et al.* 1997).

gain-of-function モデル

これまでの報告にある *gain-of-function* の CMS 遺伝子は，CDS の内部または周辺配列で組換えを起こしており，既知のミトコンドリア遺伝子とのキメラ構造をとっていることが多い。*loss-of-function* とは異なり，CMS 遺伝子を持つ植物は正常型の呼吸に関連するミトコンドリア遺伝子を保持している (Chase 2007). 見出された CMS 遺伝子には膜タンパク質をコードするものが多く含まれている。これまでの報告から，蓄積した ORF による作用は，大きく 2 つのタイプに分類できる。ひとつは，ORF が単独でオリゴマーを形成し，ミトコンドリア内膜に蓄積することで pore を形成し，プロトン勾配に影響を及ぼす場合である。もうひとつは，ミトコンドリア電子伝達系の呼吸鎖複合体に結合することで機能を阻害する場合である。

pore を形成するタイプは，トウモロコシ CMS-T の URF13，アブラナ

Ogura-CMS の ORF138, Kosena-CMS の ORF125, テンサイ Owen-CMS の preSATP6 で示された。CMS-T では, URF13 がオリゴマーを形成してミトコンドリア膜に pore を形成することが示された (Korth *et al.* 1991, Rhoads *et al.* 1995). Ogura-CMS の ORF138 は 6 量体まで形成しうることが示された (Duroc *et al.* 2005). さらに, ORF138 はミトコンドリア呼吸鎖複合体とは相互作用せず, それぞれの活性に影響しないことが示された (Duroc *et al.* 2009). *orf138* と相同性の高い CMS 遺伝子を持つ Kosena-CMS でもオリゴマーを形成することが示された (Iwabuchi *et al.* 1999). Owen-CMS では preATP6 がホモオリゴマーを形成することが示された (Yamamoto *et al.* 2005).

呼吸鎖複合体に結合するタイプは, イネ WA-CMS の WA352, HL-CMS の ORFH79 で呼吸鎖複合体との結合が示されている。WA352 はシトクロム c オキシダーゼ (complex IV) のサブユニット COX11 との結合が示されている (Luo *et al.* 2013). ORFH79 はユビキノール-シトクロム c レダクターゼ (complex III) のサブユニット P61 との結合が示されており, complex III 活性が低下することにより, ROS を発生させて PCD を引き起こすモデルが提唱されている (Wang *et al.* 2013). また, ヒマワリ CMS の ORF522 は ATP8 と相同性の高い配列を持っており, complex V の活性低下が示されている (Sabar *et al.* 2003). テンサイ GCMS では complex IV 活性が低下しており, CMS 遺伝子 *Gcox2* の変異との相関が示されている (Ducos *et al.* 2001). これらの CMS についても呼吸鎖複合体に結合するモデルが適合すると考えられる。

第 3 節 稔性回復機構

これまでに示したように, CMS の原因は CMS タンパク質の蓄積である. これまでに明らかになっている稔性回復機構は, ゲノム制御, 転写後制御, 翻訳制御, 翻訳後制御, 代謝制御に分類することができる.

ゲノム制御

ゲノム制御は, CMS 遺伝子が座乗するサブゲノム分子のコピー数を減少させることで CMS タンパク質の蓄積を抑制する制御機構である. インゲンマメ CMS-Sprite の稔性回復遺伝子 *Fr* はクローニングされていないため実体は不明であるが, *pvs* 領域を含む 25 kb のミトコンドリアゲノムのコピー数が減少すると稔性が回復するという相関が示されており, SSS による制御機構であると考えられる (Mackenzie and Chase 1990, Janska *et al.* 1998).

転写後制御

CMS 遺伝子の発現は, 稔性回復系統や CMS 系統に稔性回復系統を交雑した後代において発現量の低下やプロセッシングが起きていることが多い. クローニングされた稔性回復遺伝子のうち, CMS 遺伝子への作用が報告されているのは, イネ BT-CMS の *Rf1a* および *Rf1b*, HL-CMS の *Rf5*, LD-CMS の *Rf2*, WA-CMS の *Rf4*, ペチュニア CMS の *Rf-PPR592* である. LD-CMS の *Rf2* はグリシンリッチタンパク質をコードし, 作用機序は不明であるが CMS 遺伝子 *orf79* mRNA を分解して ORF79 タンパク質の蓄積を抑制する (Itabashi *et al.* 2011, Kazama *et al.* 2016). 他の稔性回復遺伝子は PPR タンパク質をコードしている. *Rf1a* または *Rf5* を導入すると, CMS 遺伝子はプロセッシングによる制御を受け, *Rf1b* または *Rf4* を導入すると分解される (Wang *et al.* 2006, Kazama *et al.* 2008, Hu *et al.* 2012, Luo *et al.* 2013, Kazama and Toriyama 2014). *Rf-PPR592* 導入個体での mRNA 蓄積パターンについての報告はないが, 過去の報告から稔性回復系統において 5'末端が翻訳開始点の上流 121 番目の塩基 (-121) から始まる mRNA の蓄積量が減少していたため, プロセッシングまたは分解を受けていると考えられる (Pruitt and Hanson 1991, Hanson *et al.* 1999). その結果, CMS タンパク質が蓄積しなくなることで稔性が回復する.

翻訳制御

PPR タンパク質には翻訳制御の機能を持つものもある。Ogura-CMS の *Rfo*, Kosena-CMS の *Rfk1* は、いずれも PPR タンパク質をコードしている。稔性回復系統では CMS 遺伝子の mRNA 蓄積パターンが CMS 系統と比べて変化せず、CMS タンパク質の蓄積が減少する (Koizuka *et al.* 2003, Uyttewaal *et al.* 2008). CMS タンパク質の蓄積が減少しているのは翻訳が抑制している場合とタンパク質の分解が促進していることが考えられるが、少なくとも *Rfo* と *Rfk1* は RNA 結合タンパク質という PPR タンパク質の性質から、翻訳の抑制であると考えられる。

翻訳後制御

テンサイ Owen-CMS の稔性回復遺伝子 *bvORF20* から翻訳される bvORF20 タンパク質は CMS タンパク質 preATP6 と結合することが示された (Kitazaki *et al.* 2015). Owen-CMS の雄性不稔機構は、preATP6 がホモオリゴマーを形成することでミトコンドリア膜に pore を形成することでプロトン勾配に影響を与えるとするモデルが考えられている。bvORF20 は preATP6 に結合することでホモオリゴマーの形成を崩壊させているのと考えられる。この場合、preATP6 の蓄積量は変化しない。実際に、CMS 系統と稔性回復系統では preATP6 の蓄積量に差がない。

代謝制御

トウモロコシ CMS-T の稔性回復遺伝子 *Rf2* はアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードしている。CMS タンパク質 URF13 の蓄積も稔性回復系統で変化しないため、RF2 は URF13 に起因する何らかの毒性物質を解毒することで稔性を回復しているのではないかと考えられている (Liu *et al.* 2001).

第 4 節 CMS 研究における問題点の考察

CMS の分子遺伝学的解析において、CCG を同定することは不可能である。その理由は、ミトコンドリアの形質転換法が確立されていないため、CMS 遺伝子を核ゲノムに導入して雄性不稔を示すかどうか確認できないからである。これまでは大腸菌や酵母に対する毒性を見たり、ミトコンドリア移行シグナルを付加して核ゲノムに導入することで再現の試みが行われてきた。しかしながら、完全な不稔性が再現された例は少なく、また雄性不稔性が示されたからといって、その CMS 遺伝子にコードされるタンパク質が雄性不稔性を引き起こしうることしか言えず、実際の CMS 系統において雄性不稔を引き起こす原因となっていることは示されない。また、稔性回復遺伝子と相互作用するかは示すことができない。

それに対し、稔性回復遺伝子は CMS 系統に対する遺伝子導入による相補性試験を行うことで同定することができる。同定した稔性回復遺伝子の機能を明らかにすることができれば、見出した CMS 遺伝子から CCG を選抜する上での指標とすることができる。現在、稔性回復遺伝子と CMS 遺伝子の相互作用が明らかとなっているのは、イネの BT-CMS, WA-CMS, HL-CMS, LD-CMS, アブラナの Ogura-CMS, Kosena-CMS, テンサイの Owen-CMS, ペチュニア CMS である。これらの CMS では、雄性不稔機構として転写後制御、翻訳制御、翻訳後制御が示された。これまで CMS 遺伝子を探すために、CMS 細胞質特異的な *orf* についてノーザンブロット分析やウェスタンブロット分析による解析が行われ、CMS 系統と稔性回復系統の間で蓄積パターンに違いがある遺伝子が CMS 遺伝子の候補とされてきた。しかし、mRNA またはタンパク質の蓄積パターンに違いが見られないからといって、CMS 遺伝子の候補から外すべきではないと言える。

CMS 細胞質特異的な遺伝子は、以前は既知のミトコンドリア遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析などにより通常細胞質とは異なる遺伝子構造を持つものから見出していた。近年では次世代シーケンサーによりミトコンドリアの全ゲノム配列を決定することで、通常細胞質にはコードされていない新規 *orf* をより多く見出すことができるようになった。その結果、CMS 遺伝子の候補が膨大な数になってしまったため、従来のように全ての候補についてノーザンブロット分析やウェスタンブロット分析を行うことは現実的ではない。理想的

にはミトコンドリアの全タンパク質解析や RNA シーケンス解析により転写・翻訳されている *orf* を絞り込むのが望ましい。絞り込んだ CMS 遺伝子について、同定した稔性回復遺伝子との相互作用を見出すことにより、ようやく CCG を同定することができる。

以上の理由により、CMS 研究においては確実に同定することのできる稔性回復遺伝子を見出し、その機能から稔性回復機構の解明を行うとともに、CMS 遺伝子の候補から稔性回復遺伝子と相互作用するものを探索して CMS 遺伝子を選抜していくことで、雄性不稔機構を明らかにすることができると考えられる。

第 2 章 RT98-CMS の稔性回復遺伝子の同定

第 1 章の考察から、稔性回復遺伝子の同定は CMS 遺伝子の解析よりも優先すべきであると考えられる。そのため、まず RT98-CMS に対する稔性回復遺伝子をクローニングすることを目的とした。稔性回復遺伝子同定を円滑に進めるため、CMS 系統と稔性回復系統の表現型の比較についても本章に含めることにする。

CMS 系統 RT98A の花粉は見かけ上正常に発達することが報告されている (Motomura *et al.* 2001)。この報告では開花前日の花粉を観察しているため、正確には開花前日まで正常に発達していると言える。イネの花粉は開花後にデンプンの糖化が行われることが知られており、イネの CMS では、CW-CMS の CMS 系統 CWA の花粉が見かけ上正常に発達するが、開花後のデンプン糖化が起こらないことが報告されている (Fujii and Toriyama 2009)。そのため、第 1 節では RT98-CMS においても開花後の花粉まで観察を行い、CMS 系統の表現型を稔性回復系統と比較し、稔性回復の指標を見出すことを目的とした。また、これまでに報告されている他の CMS 系統との比較により RT98-CMS の特徴を評価した。

RT98-CMS に対する稔性回復遺伝子は、第 10 染色体に座乗する BT-CMS の稔性回復遺伝子 *Rf1* のアレルであると報告されている (Motomura *et al.* 2003)。そのため、第 10 染色体に座乗する RT98-CMS に対する稔性回復遺伝子を *Rf98* と命名し、マッピングおよびクローニングを行った。

第 1 節 RT98-CMS の表現型の観察

方法

ヨウ素ヨウ化カリウム (I₂-KI) 染色

葯を固定液 (75% (v/v) ethanol, 25% (v/v) acetic acid) で固定した後, 花粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液 (20% (w/v) sucrose, 1% (w/v) I₂-KI) で染色し, 光学顕微鏡 (OLYMPUS BX41) で観察を行った.

DAPI 染色

固定した葯を DAPI 染色液 (20% (w/v) sucrose, 0.0001% (w/v) DAPI) で染色し, 蛍光顕微鏡で観察を行った.

アニリンブルー染色

開花 6 時間後の雌しべを水酸化カリウム溶液 (1N KOH) に浸し, 55°C で 5 分間インキュベートした後, アニリンブルー溶液 (2% (w/v) K₃PO₄, 0.01% (w/v) aniline blue) で染色し, 蛍光顕微鏡で観察を行った.

結果

RT98A は稔実が全く見られず，完全不稔であった．RT98A の減数分裂期から 3 細胞期の花粉について光学顕微鏡で観察を行ったところ，RT98C や T65 と同様に見かけ上正常に発達することがわかった（図 1）．また，開花前日の穎花や葯も外見上正常に発達していた（図 2）． I_2 -KI 染色によるデンプン蓄積の観察では，開花前日における正常なデンプン蓄積および開花後における正常なデンプン糖化が観察された（図 2）．DAPI 染色による核の観察では，開花前日の花粉において正常に核分裂が起きていることが示された（図 2）．開花後においても，葯の裂開異常，花粉の放出異常などは見られなかった．しかしながら，受粉後の柱頭をアニリンブルー染色後に観察すると，RT98A では花粉の発芽が起きていないことがわかった（図 2）．

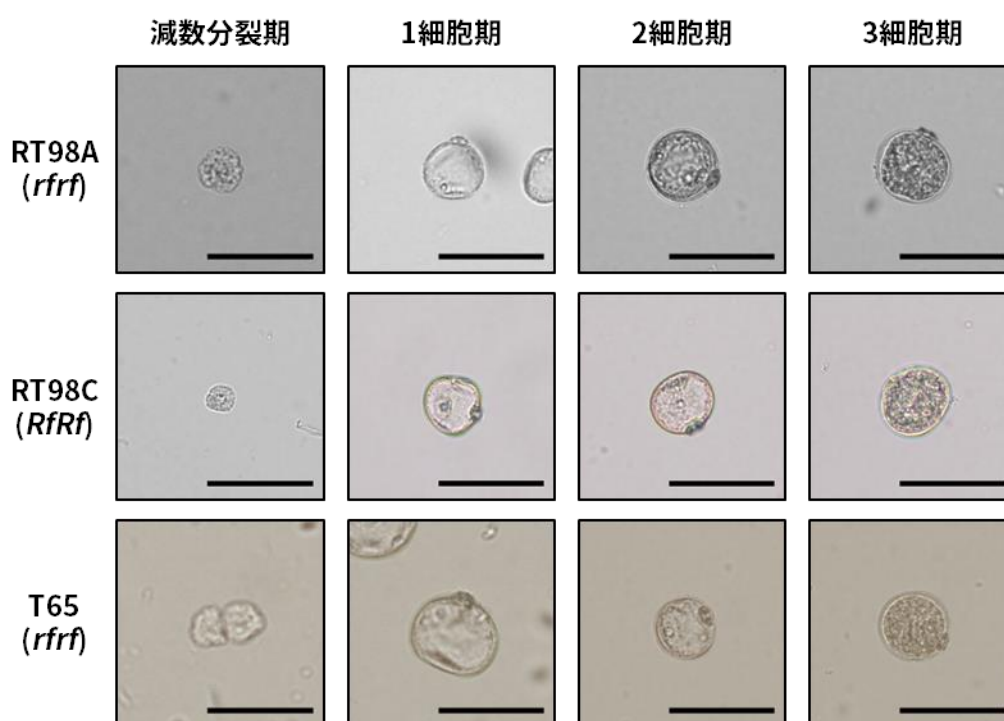


図 1 RT98-CMS の表現型観察 (減数分裂期~3 細胞期)

Bars = 50 μ m

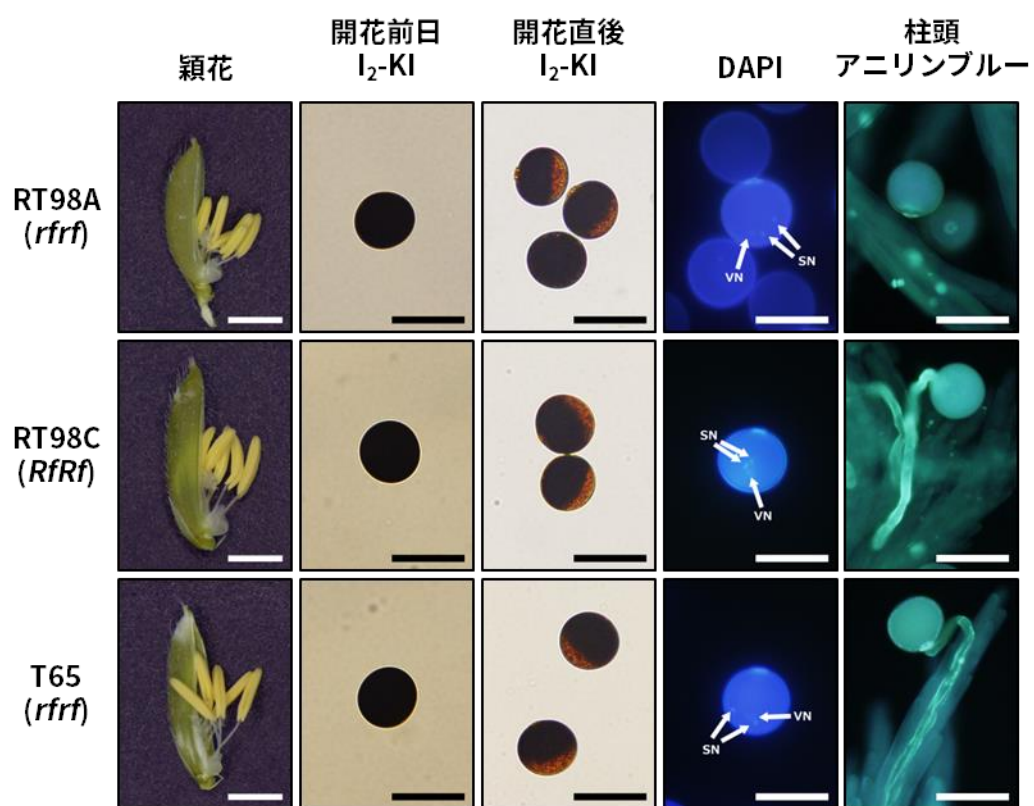


図 2 RT98-CMS の表現型観察 (穎花および 3 細胞期~開花後)

Bars = 2 mm (穎花), Bars = 50 μ m (I₂-KI, DAPI, アニリンブルー)

SN: 精核, VN: 栄養核

考察

イネの花粉発達は 14 のステージに分類される (Zhang and Wilson 2009). これまでに報告されたイネ CMS の表現型について, どの生育ステージで発達が停止したと考えられるかという視点で見ると, WA-CMS はステージ 9 (カロース壁の分解, 小胞子の開放) からステージ 10 (小胞子が空胞化して円形になる) の間, HL-CMS はステージ 10, LD-CMS と BT-CMS はステージ 10 からステージ 12 (3 細胞期), CW-CMS はステージ 12 からステージ 13 (開花, 葯の裂開) の間でそれぞれ発達が停止したと見るができる. 一方, RT98-CMS では RT98A の花粉はステージ 14 (開花後, 花粉の放出) でも正常にデンプンの糖化が起きており, 少なくともデンプンの蓄積および糖化を指標とした花粉発達の評価において異常は見られなかった. RT98A 花粉の異常が顕在化するのは受粉後, 花粉が発芽するタイミングであり, 花粉の発芽が起こらない. そのため, RT98-CMS は花粉の発芽に異常が生じることで不稔となるタイプの CMS であり, これまでに報告のある CMS の中では最も発達が進行することがわかった. そのため, 表現型の観察から他の CMS 系統とは異なる雄性不稔機構が働いていることが推測された.

稔性回復遺伝子同定に際して, LD-CMS では花粉稔性の評価, CW-CMS ではデンプンの糖化した花粉の割合での評価が稔実率調査に加えて行われた (Itabashi *et al.* 2011, Fujii and Toriyama 2009). しかしながら, RT98-CMS では花粉観察による稔性の判断がつかないため, 稔実率以外の評価が困難であると考えられた. そのため, 第 2 節の稔性回復遺伝子の同定では稔実率を指標として評価を行うこととした.

第 2 節 RT98-CMS に対する稔性回復遺伝子の同定

方法

DNA 抽出

1 cm² の葉断片を 2 時間以上乾燥させ、ガラスビーズ (BZ-3, AS ONE) と共に Tissue Lyser (QIAGEN) で粉砕し、1×抽出バッファー (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 7.5) を加えて 10 分間静置後、20,000×g で 20 分間遠心分離した。上清を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した後、等量のイソプロパノールを加え懸濁し、20,000×g で 15 分間遠心分離を行い、沈殿を 1/5×TE (2 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.5) に溶解した。

Rf98 のマッピング

RT98-CMS は配偶体型の稔性回復様式を示す (Motomura *et al.* 2001)。そのため、RT98C×T65 F₁ (*Rfrf*) および RT98C×T65 BC₁F₁ (*Rfrf*) の自殖後代には *Rf* を持つ花粉のみが受精し、母親からは *Rf* または *rf* が遺伝する。自殖後代において、父親からは RT98C の W1109 由来の領域が T65 に組換えが起きた染色体、母親からは *rf* が遺伝した個体を選抜するために、RT98C×T65 F₂ および RT98C×T65 BC₁F₂ において SSR マーカーおよび InDel マーカーを用いて、T65 ホモを示す個体を選抜することで *Rf98* の候補領域を狭めた。使用したマーカーの一覧は補足資料 1 に記載した。

アクリルアミド電気泳動

電気泳動には 8% のポリアクリルアミドゲル (8% acrylamide and bis-acrylamide solution (19:1), 0.5×TBE (89 mM Tris, 2 mM EDTA, 89 mM boric acid), 5% glycerol, 0.001% APS, 0.1% TEMED), 泳動 Buffer には 0.5×TBE を用いた。EtBr (BIO RAD) で染色後、プリントグラフ (AE-6932GXCF, ATTO) で検出した。

相補性試験

RT98C ゲノムの BAC ライブラリーの作成および選抜は農業生物資源研究所に委託した。BAC クローンの選抜にはマーカー SSRH10018, SSRH10032,

SSRH10036, SSRH10040 を用いた. 選抜した BAC クローンのシーケンスは Roche の GS-FLX システムおよび農業生物資源研究所の ABI3730 システム (サンガー法) により決定した.

BAC クローンは制限酵素 *Xba*I, *Sac*I, *Kpn*I, *Pst*I を使用して切断し, 得られた DNA 断片はバイナリーベクター pZH2B に挿入した (Kuroda *et al.* 2010). クローニングしたゲノム断片は CEQ8000 シーケンサー (Beckman Coulter) を用いてシーケンスを確認した. バイナリープラスミドはアグロバクテリウム EHA101 に導入し, アグロバクテリウム法 (Toki *et al.* 2006) を用いて CMS 系統 RT98A に遺伝子導入して相補性試験を行った.

結果

Rf98 のマッピングに使用したマーカーおよび選抜した組換え個体数, BAC クローンのカバーする領域, 予測された遺伝子, クローニングしたゲノム断片を図 3 にまとめた. RT98C×T65 の F₂ 1248 個体および (RT98C×T65)×T65 の BC₁F₂ 6432 個体から, 第 10 染色体の SSR1041 から SSR10108 の領域で組換えが起きていた個体 R1~R8 を選抜することができた. 見出した組換え個体について, それぞれのマーカーにおける遺伝子型および後代における稔実率を表 13 に示す. 稔実率は袋がけを行わずに調査した. RT98A にも若干の着粒があったが, 袋がけを行った状態では RT98A は完全不稔であるので, 他の系統の花粉が受粉したため若干の着粒があったものと考えられる. マッピングの結果, *Rf98* の候補領域はマーカー SSRH10027 から InDelT003 の間であることがわかった.

作成した BAC ライブラリーから, *Rf98* 候補領域をカバーする BAC クローンを選抜した結果, BAC クローン RT98C42E07 を選抜することができた. この BAC クローンのシークエンスを決定した結果, マーカー SSRH10027 と InDelT003 の間の領域は約 170 kb であることがわかった.

Rf98 候補領域に含まれる遺伝子を Flowering Plant Gene Picker (Amano *et al.* 2010; <http://fpgp.dna.affrc.go.jp/>) を用いて予測した. その結果, *Rf98* 候補領域には 18 個の *orf* が予測された (表 14). このうち, 8 個の遺伝子については全て PPR タンパク質をコードする遺伝子と予測されたため, それぞれの遺伝子についてコードするアミノ酸数に応じて命名した. *Rf* はミトコンドリアに移行するタンパク質をコードすると予測されるため, 細胞内局在予測プログラム Predotar (Small *et al.* 2004) を用いてミトコンドリアへの移行が予測されるタンパク質をコードする遺伝子を予測した. プログラムのスコア 0.7 以上を示すタンパク質がミトコンドリアに局在すると仮定した結果, 7 個の PPR タンパク質をコードする遺伝子 (*PPR830*, *PPR791a*, *PPR791b*, *PPR791c*, *PPR777*, *PPR776*, *PPR762*) を選抜することができた. これら 7 つの遺伝子に加え, ネガティブコントロールとして *PPR332* を加えた 8 つの遺伝子についてはプロモーター領域, ターミネーター領域が不明であったため, 上流側の約 3.0 kb, 下流側の約 2.1 kb を含むゲノム断片をクローニングした (図 4). それぞれの塩基配列は DDBJ に登録した (accession No. LC131121–LC131128). それらのゲノム断片を RT98A に導入

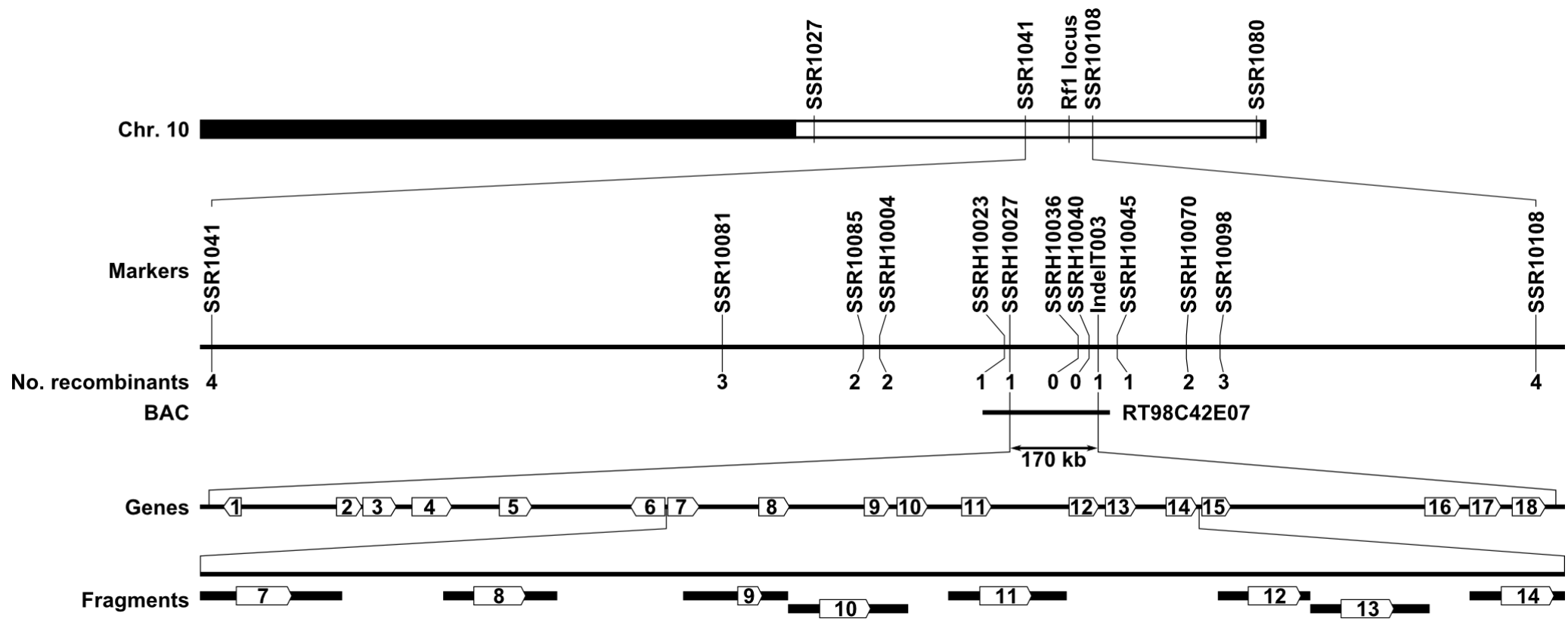


図 3 *Rf98* のマッピング

Fragments は相補性試験に使用した遺伝子のゲノム断片を示す.

表 13 組換え個体の遺伝子型および稔実率

マーカー	RAP-position (kb)	RT98C	RT98A	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
SSR1041	18,006	C	T	T	T	T	T	H	H	H	H
SSR10081	18,572	C	T	H	T	T	T	H	H	H	H
SSR10085	18,727	C	T	H	H	T	T	H	H	H	H
SSRH10004	18,746	C	T	H	H	T	T	H	H	H	H
SSRH10023	18,883	C	T	H	H	T	T	H	H	H	H
SSRH10027	18,888	C	T	H	H	H	T	H	H	H	H
SSRH10036	18,964	C	T	H	H	H	H	H	H	H	H
SSRH10040	18,976	C	T	H	H	H	H	H	H	H	H
IndelT003	18,985	C	T	H	H	H	H	T	H	H	H
SSRH10045	19,006	C	T	H	H	H	H	T	H	H	H
SSRH10070	19,083	C	T	H	H	H	H	T	T	H	H
SSR10098	19,120	C	T	H	H	H	H	T	T	T	H
SSR10108	19,473	C	T	H	H	H	H	T	T	T	T
稔実率 (%)		81.9	3.9	65.3	77.3	17.4	22.7	63.7	78.8	67.7	76.8

C: RT98C ホモ, T: T65 ホモ, H: RT98C/T65 ヘテロ

稔実率は後代でそれぞれ RT98C 由来の領域がホモである個体を選抜し、水田において袋がけを行わずに調査した。RT98A にも若干の着粒があったが、袋がけを行った状態では RT98A は完全不稔である。

表 14 *Rf98* 候補領域に予測された遺伝子のコードするタンパク質および細胞内局在予測

アノテーション	RAP-ID	細胞内局在予測
1 Conserved hypothetical protein. (Os10t0496550-00)	Os10g0496550	Not predicted
2 Conserved hypothetical protein. (Os10t0496600-01)	Os10g0496600	possibly ER (0.37)
3 Similar to Protochlorophyllide reductase B, chloroplastic. (Os10t0496900-01); NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase, Chlorophyll synthesis (Os10t0496900-02)	Os10g0496900	Plastid (0.95)
4 Armadillo-type fold domain containing protein. (Os10t0497000-01)	Os10g0497000	Elsewhere (0.83)
5 Similar to 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, chloroplast precursor (EC 2.3.1.51) (Lysophosphatidyl acyltransferase 1). Splice isoform 2. (Os10t0497100-01)	Os10g0497100	Mitochondria (0.55)
6 Hypothetical protein. (Os10t0497200-00)	Os10g0497200	Elsewhere (0.98)
7 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR830)	なし	Mitochondria (0.86)
8 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR776)	なし	Mitochondria (0.74)
9 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR332)	なし	Elsewhere (0.98)
10 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR762)	なし	Mitochondria (0.74)
11 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR777)	なし	Mitochondria (0.74)
12 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR791b)	なし	Mitochondria (0.74)
13 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR791c)	なし	Mitochondria (0.74)
14 Pentatricopeptide repeat domain containing protein (PPR791a)	なし	Mitochondria (0.74)
15 K Homology, type 1, subgroup domain containing protein. (Os10t0497500-01)	Os10g0497500	Not predicted
16 Serine/threonine protein kinase-related domain containing protein. (Os10t0497600-01); Serine/threonine protein kinase-related domain containing protein. (Os10t0497600-02)	Os10g0497600	Elsewhere (0.80)
17 Similar to Phytochelatin synthetase. (Os10t0497700-01); Similar to COBRA-like protein 4. (Os10t0497700-02)	Os10g0497700	ER (0.99)
18 Similar to Prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit-like protein. (Os10t0497800-01)	Os10g0497800	Elsewhere (0.82)

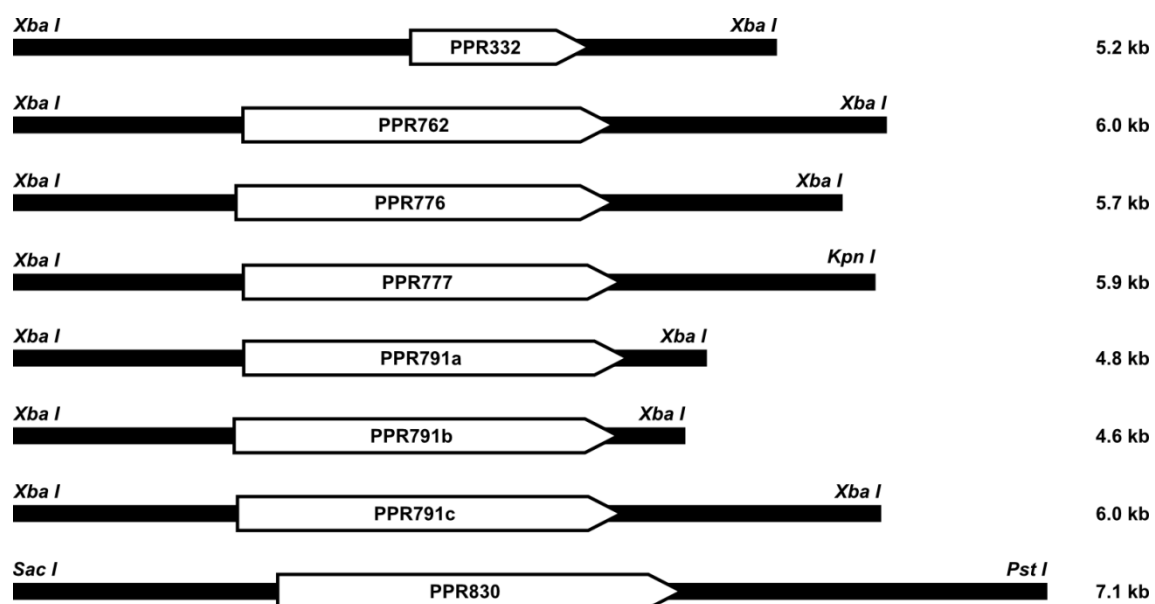


図 4 クローニングした *Rf98* 候補遺伝子のゲノム断片

表 15 得られた形質転換個体数と稔性回復個体数

ゲノム断片	個体数	
	調査個体数	稔性回復個体数
Vector	2	0
<i>PPR332</i>	9	0
<i>PPR762</i>	23	16
<i>PPR776</i>	2	0
<i>PPR777</i>	5	0
<i>PPR791a</i>	12	0
<i>PPR791b</i>	7	0
<i>PPR791c</i>	5	0
<i>PPR830</i>	16	0

稔性回復個体数は稔実がわずかでも認められた個体を集計した。

することで相補性試験を行った。

得られた形質転換体の個体数および稔性が回復した個体数を表 15 に示す。第 1 節で考察したように、RT98A は花粉の形態観察から稔性を評価することができないため、稔実率の評価のみ行った。ネガティブコントロールの空ベクターと *PPR332*, および *PPR830*, *PPR791a*, *PPR791b*, *PPR791c*, *PPR777*, *PPR776* を導入した形質転換体は完全不稔であった。これに対し、*PPR762* を導入した個体では、得られた形質転換体 23 個体中 16 個体で稔性の回復が確認できた (図 5A)。16 個体中、最も稔実率が高かったのは #23 の 9.3% であり、最大で 1 穂あたり 15.9% の稔実率を示した (図 5B)。

これらの結果から、稔性回復遺伝子 *Rf98* は 762 アミノ酸の PPR タンパク質をコードする *PPR762* であることがわかった。

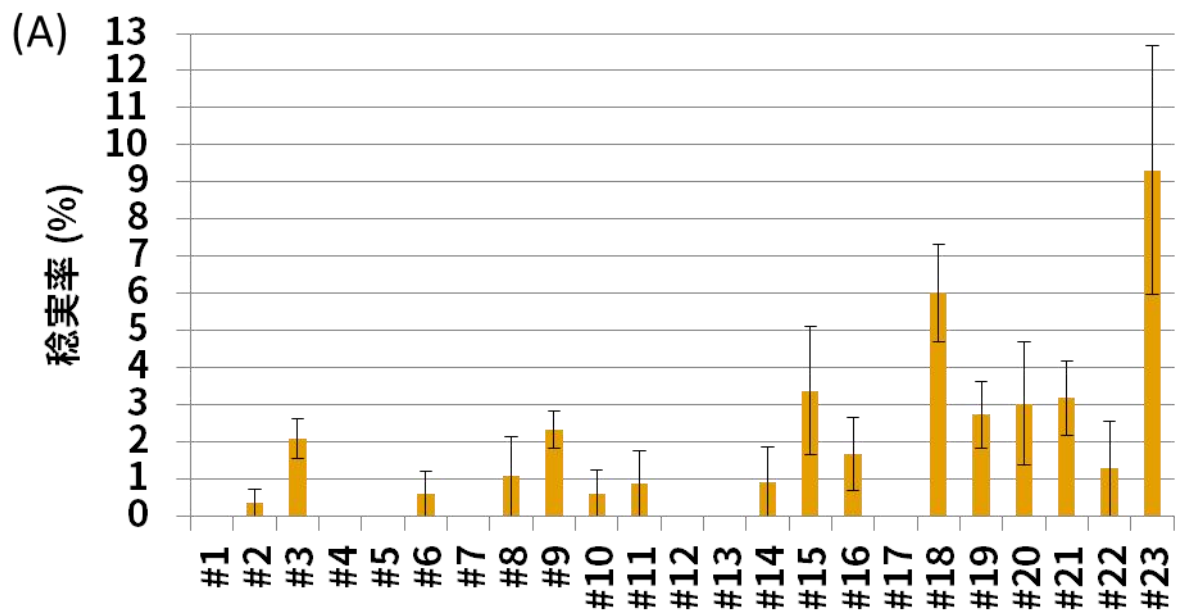


図 5 相補性試験

(A) *PPR762* 導入個体の稈実率 (%).

(B) #23 の稈実した穂．稈実率は 15.9%．Bar = 1.0 cm

考察

RT98-CMS の稔性回復遺伝子 *Rf98* は PPR タンパク質をコードしていた。第 1 章で述べたように、これまでにクローニングされた稔性回復遺伝子には PPR タンパク質をコードするものが多く、イネ BT-CMS の *Rf1a* および *Rf1b*, HL-CMS の *Rf5* および *Rf6*, WA-CMS の *Rf4*, アブラナ Ogura-CMS の *Rfo*, Kosena-CMS の *Rfk1*, ペチュニア CMS の *Rf-PPR592*, ソルガム CMS-A1 の *Rf1* が挙げられる。これまでの報告から、PPR タンパク質には RNA のプロセッシング、スプライシング、分解、翻訳の制御に関与する P タイプと、RNA 編集に関与する PLS タイプが報告されている (Delannoy *et al.* 2007, Schmitz-Linneweber and Small 2008, Manna 2015)。PPR762 の機能を予測するために、PPR762 のアミノ酸配列から PPR のタイプを予測した。候補領域に存在した 8 つの PPR 遺伝子から翻訳される PPR タンパク質について TPRpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>; Karpenahalli *et al.* 2007) を用いて PPR モチーフを予測したところ、これらの PPR タンパク質は P タイプの PPR タンパク質であり、PPR762 は 18 個の PPR モチーフを持つことが判明した (図 6)。そのため、PPR762 の機能は RNA のプロセッシング、スプライシング、分解、翻訳の制御のいずれかであり、CMS 遺伝子の転写後制御または翻訳制御により稔性を回復していると考えられた。

PPR762 を導入した形質転換体では、最大で 15.9% の稔実率を示した (図 5B)。しかしながら、この稔実率は稔性回復系統 RT98C と比較すると大幅に低下している。RT98C×T65 の F₁ (*Rf98rf98*) では RT98C (*Rf98Rf98*) に比べ、わずかに稔実率が低下することが報告されている (Motomura 2002)。形質転換体の T₀ 世代では *Rf* はヘテロの状態であると考えられるが、報告にある稔実率の低下と比較しても明らかに低下していると考えられる。この原因を考察するため、マッピングで得られた組換え個体 R1~R8 の後代について、それぞれの RT98C 由来の領域がホモである個体を選抜し、稔実率を調査したところ、R3 および R4 において、RT98C や他の組換え個体と比較して稔実率が低下していることが明らかとなった (表 13)。R3 および R4 が保持する領域には PPR762 が存在することから、稔性回復遺伝子 *Rf98* は稔性回復に必須の遺伝子であるが、稔性の完全な回復にはそれだけでは不十分であり、R3 や R4 において T65 に置換された領域には単独では機能しないが稔性回復遺伝子 *Rf98* の機能を補助して稔実率を向上させる

[illegible]

働きを持つ稔性回復補助遺伝子が存在していることが考えられた。このことから、稔性回復補助遺伝子はマーカー SSRH10081 と SSRH10027 の間、日本晴ゲノム相当で 316 kb の領域に存在することがわかった。

稔性回復補助遺伝子の機能については 2 つの機構が考えられる。(i) 補助遺伝子および稔性回復遺伝子 *Rf98* から翻訳されるタンパク質が相互作用し、CMS 遺伝子に対する作用力を強化する機能補助型の稔性回復機構、(ii) RT98-CMS の CMS 遺伝子が複数存在し、*Rf98* が制御する CMS 遺伝子は完全不稔遺伝子、稔性回復補助遺伝子が制御する CMS 遺伝子は部分不稔遺伝子であるとする複数原因遺伝子制御型の稔性回復機構である。

(i) の機能補助型の場合、稔性回復遺伝子と稔性回復補助遺伝子それぞれから翻訳されるタンパク質同士が相互作用することが考えられる。相互作用しない場合は補助遺伝子のみでも機能すると考えられるため、マッピングの結果と矛盾する。稔性回復複合体 (restoration of fertility complex: RFC) の例として、イネ HL-CMS の *Rf5* と *GRP162* および *Rf6* と *OsH XK6* が挙げられる。HL-CMS の稔性回復遺伝子 *Rf5* は P タイプの PPR タンパク質をコードしており、CMS 遺伝子 *orfH79* のプロセッシングに関与する。しかしながら、RF5 単独では *orfH79* mRNA に対する結合能力を持たず、代わりにグリシンリッチタンパク質をコードする *GRP162* が *orfH79* mRNA への結合および RF5 との相互作用の働きを持つ (Hu *et al.* 2012)。また、*Rf6* も P タイプの PPR タンパク質をコードしているが、こちらも単独では *orfH79* mRNA には結合せず、さらに *GRP162* とも相互作用しない (Huang *et al.* 2015)。代わりに RF6 はヘキソキナーゼ *OsH XK6* との相互作用が示されており、*OsH XK6* を RNAi によりノックダウンすると *orfH79* mRNA のプロセッシング効率が低下する。そのため、*OsH XK6* は mRNA のプロセッシングを行う因子を RF6 に誘導しているのではないかと考えられる。よって、これらのモデルを本実験に当てはめた場合は RF98 のターゲット配列に対する結合能力が低いこと、もしくは mRNA のプロセッシング因子をうまく RF98 に誘導できないことが稔実率の低下の原因であり、稔性回復補助遺伝子にコードされるタンパク質はターゲット配列への結合を強化するもの、もしくはプロセッシング因子を RF98 に誘導する役割を持っていると考えられる。

(ii) の複数原因遺伝子制御型の場合、RT98-CMS のミトコンドリアには完全不

稔を引き起こす CMS 遺伝子の他に，雄性不稔発現の効果が弱い CMS 遺伝子が存在する可能性がある．稔性回復遺伝子 *Rf98* は CMS 遺伝子のひとつを完全に制御し，稔性回復補助因子は雄性不稔効果が弱いもう一方の CMS 遺伝子を制御していると考えられる．第 1 章で述べたように，CMS 遺伝子を選抜するためには稔性回復遺伝子を同定することが望ましい．これまでに複数の稔性回復遺伝子が同定された CMS 系統の組み合わせは，BT-CMS の *Rf1a* と *Rf1b* 及び *Rf2* (Wang *et al.* 2006, Kazama *et al.* 2008, Kazama *et al.* 2016), HL-CMS の *Rf5* と *Rf6* (Hu *et al.* 2012, Huang *et al.* 2015) が報告されているが，これらの稔性回復遺伝子はそれぞれ単一の CMS 遺伝子 *orf79* と *orfH79* に関与する．これまでに複数の CMS 遺伝子の関与が報告された例は無いが，可能性を否定することもできない．そのため，今後稔性回復補助遺伝子を同定した場合，対象とする CMS 遺伝子を決定する場合は複数の CMS 遺伝子が関与する可能性について考慮する必要がある．

第 3 章 RT98-CMS の CMS 遺伝子候補の探索

第 1 章で示したように、従来 CMS 遺伝子決定のためには、サザンブロット分析や全ゲノム配列の決定によって CMS 細胞質に特異的に存在する遺伝子の探索が行われてきた。本研究では次世代シーケンサーによるミトコンドリアゲノムの決定から CMS 遺伝子の候補となる *orf* を探索する方針を採用した。第 1 節では RT98 型ミトコンドリアのゲノムシーケンスの決定から *orf* の選抜を行い、配列的特徴から CMS 遺伝子の候補について考察を行った。第 2 節では選抜した *orf* について RNA レベルの解析を行い、転写後制御の可能性について考察した。第 3 節では転写後制御が行われている可能性が見出された *orf113* について、大腸菌で発現させた時の挙動を調査するとともに、ORF113 タンパク質蓄積の検出を試みた。

第 1 節 RT98 型ミトコンドリアのゲノムシーケンス解析

方法

ミトコンドリア精製および DNA 抽出

イネ種子からのカルスの誘導には N6CI 培地を用いた (Yokoi *et al.* 1997). カルスからのミトコンドリア精製は Tanaka らの方法に従った (Tanaka *et al.* 2004). DNA は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用し、キットに付属するプロトコルに従って抽出した.

シーケンス解析

ミトコンドリアゲノム配列は Roche の次世代シーケンサー GS-FLX システムを用いて解読した. 得られたシーケンスデータは GS De Novo Assembler version 2.3 でアッセンブルを行った. 核ゲノムのコンタミネーションを取り除いた後, Bentolila らの方法に従い, 日本晴のミトコンドリアゲノム (DDBJ accession No. BA000029; Notsu *et al.* 2002) を参照配列にして配列を調整した (Bentolila and Stefanov 2012). 得られたコンティグは Fujii らの方法に従い連結し, PCR による連結部の確認を行った (Fujii *et al.* 2010). 繋がらないギャップに関しては CEQ8000 シーケンサー (Beckman Coulter) を用いて塩基配列を解読した. PCR に用いたプライマーは補足資料 2 に記載した.

結果

シーケンス解析の結果, RT98 型ミトコンドリアゲノムを 525,913 bp の単一環状配列として決定し, 塩基配列を DDBJ に登録した (accession No. AP012527). 次に, 決定したゲノム配列から *orf* を予測し, CMS 遺伝子の候補とした. これまでに報告された CMS 遺伝子がコードするタンパク質の大きさを参考に, 70 アミノ酸以上のタンパク質をコードするものが CMS 遺伝子として妥当と考え, 一段回目の選抜を行った. その結果, 645 個の *orf* を選抜することができた. 次に, 二段階目の選抜として, *orf* の配列を日本晴のミトコンドリアゲノムと比較し, RT98 ミトコンドリアに特異的な *orf* を選抜した結果, 27 個の *orf* を選抜することができた (表 16). 見出した *orf* はコードするアミノ酸の数に基いて命名し, BLAST 検索によって既知のゲノム配列との相同性を調査した. これらには既知の核ゲノム配列との相同性を示すものや, 他の CMS 細胞質が持つ既知のミトコンドリアゲノム配列との相同性を示すものが存在することがわかった. さらに候補を絞り込むための三段階目の選抜として, これまで見出された CMS 遺伝子の特徴である, 既知のミトコンドリア塩基配列とのキメラ構造を持つこと, 膜貫通領域をコードするものを選抜した. 膜貫通領域は TMHMM server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; Krogh *et al.* 2001) を用いて予測した. 最終的に *orf340*, *orf276*, *orf210*, *orf174*, *orf113*, *orf83a* を CMS 遺伝子の候補として選抜した.

orf340, *orf276*, *orf174*, *orf113*, *orf8a* のコードするタンパク質は膜貫通領域を保持することが予測された. また, *orf276*, *orf210*, *orf113* は既知のミトコンドリア遺伝子と相同性を示す配列を保持するキメラ構造をとっていたため, コード領域の周辺についても相同性を見ることで, どのような構造となっているか詳しく調査した. *orf276* のコード領域は日本晴の *orf224*, *orf288* と高い相同性を示し, さらにイネ WA-CMS の CMS 遺伝子 WA352 との相同性も示した (図 7A). 上流側には *rpl5* の上流領域と相同性を示す配列と, *atp6* の下流領域と相同性を示す配列が存在した. 下流には *atp9* の下流領域との相同性を示す配列が存在した. *orf210* には日本晴の *orf224* に加え, イネ CW-CMS の CW-*orf307* との相同性が示された (図 7B). 実際には *orf224* の周辺配列が分割するように相同性を示す領域が配置しており, また上流領域には *atp8* との相同性を示す配列が存在し, 下

流には *nad4* のエキソン 4 の上流領域との相同性を示す配列が存在していた.
CW-orf307 との相同性を示す領域は *orf224* と相同性を示す領域と重複していた.
orf113 には *nad9* との相同性が示された (図 7C). また, *orf113* は下流に *atp4* と
cox3 が存在してるということが明らかになった.

表 16 RT98 ミトコンドリアに特異的な *orf*

ゲノム上の位置*	名称	膜貫通領域数	既知のミトコンドリア ゲノム配列とのキメラ構造	相同性を示す領域	相同性 (%)	相同性を示す既知の既知の核ゲノム配列 またはミトコンドリアゲノム配列
4679:5701 forward	<i>orf340</i>	1	なし	なし	なし	なし
112764:113594 reverse	<i>orf276</i>	2	あり	275~831	96	NP (<i>orf224+orf288</i>)
250266:250898 forward	<i>orf210</i>	0	あり	327~569	95	NP (<i>orf224+CW-orf307</i>)
405194:405718 forward	<i>orf174</i>	1	なし	317~522	99	chr 6
408933:409418 reverse	<i>orf161</i>	0	なし	1~388	100	NP, PA64S, 93-11(tRNA-Cys)
101409:101840 reverse	<i>orf143</i>	0	なし	1~97	100	chr 2
169876:170262 forward	<i>orf128</i>	0	なし	1~387	100	LD-CMS, CW-CMS
262401:262763 forward	<i>orf120</i>	0	なし	1~363	100	chr 1
401879:402238 forward	<i>orf119</i>	0	なし	78~360	100	chr 12
6225:6581 forward	<i>orf118</i>	0	なし	なし	なし	なし
108543:108890 reverse	<i>orf115</i>	0	なし	1~348	100	LD-CMS
264626:264967 forward	<i>orf113</i>	1	あり	-150~19	98	<i>nad9</i>
103009:103335 forward	<i>orf108</i>	0	なし	141~241	100	chr 12
403137:403457forward	<i>orf106</i>	0	なし	1~321	100	chr 12
3678:3968 forward	<i>orf96</i>	0	なし	229~265	94	Boea Mt
403788:404063 forward	<i>orf91</i>	0	なし	1~276	100	chr 12
171266:171532 reverse	<i>orf88</i>	0	なし	1~257	100	LD-CMS, CW-CMS, NP chr 12
401898:402158 reverse	<i>orf86</i>	0	なし	1~208	100	chr 12

表 16 続き

ゲノム上の位置*	名称	膜貫通領域数	既知のミトコンドリア ゲノム配列とのキメラ構造	相同性を示す領域	相同性 (%)	相同性を示す既知の既知の核ゲノム配列 またはミトコンドリアゲノム配列
5885:6136 reverse	<i>orf83a</i>	1	なし	139~252	92	Sorghum Mt
170584:170835 reverse	<i>orf83b</i>	0	なし	1~252	100	LD-CMS, CW-CMS, NP chr 12
9132:9371 reverse	<i>orf79</i>	0	なし	なし	なし	なし
408544:408780 reverse	<i>orf78a</i>	0	なし	1~233	100	chr 12
8414:8650 reverse	<i>orf78b</i>	0	なし	なし	なし	なし
113040:113270 forward	<i>orf76</i>	0	なし	1~231	96	LD-CMS, NP, 93-11, PA64S
405130:405348 forward	<i>orf72</i>	0	なし	148~208	100	chr 11
264164:264379 reverse	<i>orf71</i>	0	なし	1~216	100	chr 1
262457:262669 reverse	<i>orf70</i>	0	なし	1~213	100	chr 1

* DDBJ アクセッション番号 AP012527 における塩基配列の場所と向き

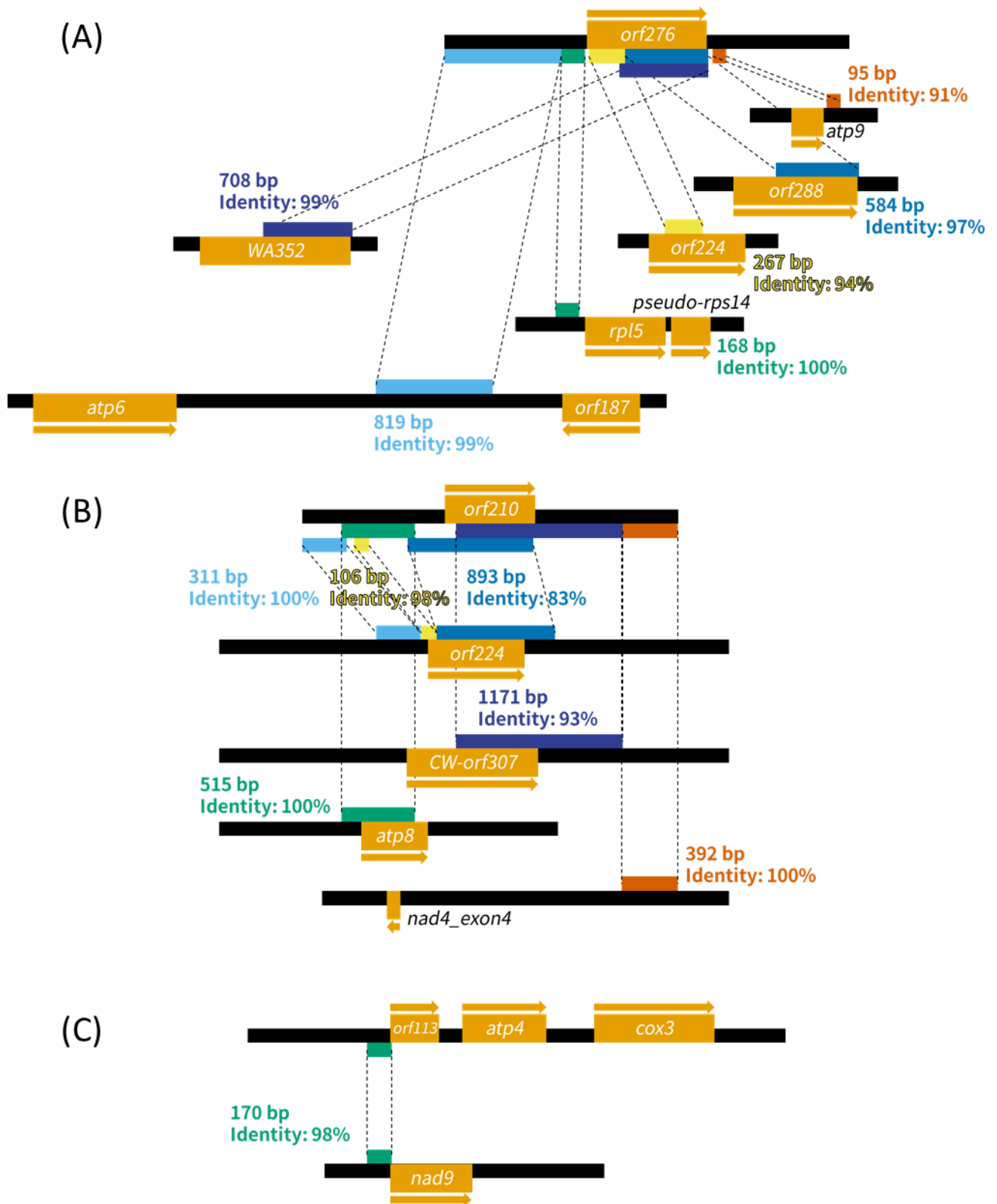


図 7 *orf276*, *orf210*, *orf113* のキメラ構造

考察

これまでに見出されている CMS 遺伝子の配列的特徴である既知の遺伝子とのキメラ構造を有し、コードするタンパク質が膜貫通領域を保持するという条件で 6 つの *orf* を選抜した。これらの *orf* は、RT98 ミトコンドリアが持つ *orf* のうちでは CMS 遺伝子の最有力候補であると考えられる。

この 6 つの *orf* のうち、既知の CMS 遺伝子との相同性が示されたのは *orf276* と *orf210* である。*orf210* との相同性を示す配列を持つ *CW-orf307* は、CW-CMS において特異的に存在するキメラ遺伝子として見出された (Fujii *et al.* 2010). *CW-orf307* の mRNA は CMS 系統と稔性回復系統の間で蓄積パターンに違いが無く、*CW-ORF307* の蓄積は報告されておらず、稔性回復遺伝子 *Rf17* の機能も不明である。そのため、CMS 遺伝子としての特徴は配列の特異性と *CW-orf307* が転写されていることのみであり、CW-CMS の CCG として機能するかは不明である。*orf276* との相同性を示す WA352 については、WA352 と COX11 の相互作用が示されている (Luo *et al.* 2013). COX11 と相互作用を示す領域は *orf276* との相同性が示される領域を含んでいたため、ORF276 と COX11 が相互作用する可能性が考えられる。*orf276* は RT102-CMS の CMS 遺伝子である *orf352* とも同様に相同性を示した。しかしながら、*orf352* については RT102-CMS の稔性回復遺伝子がクローニングされておらず、ORF352 の蓄積も確認されていない。

以上のことから、見出した *orf* の配列的特徴からは *orf276* から翻訳される ORF276 が COX11 と相互作用する可能性が示唆されるのみであった。しかしながら、塩基配列や周辺の構造が BT-CMS や LD-CMS, HL-CMS のように酷似しているとは言えないため、この特徴のみで *orf276* を CMS 遺伝子の最有力候補と判断することはできないと考えられる。そのため、これら 6 つの *orf* についての解析を行った。

第 2 節 RT98A と RT98C におけるミトコンドリア転写産物の比較

方法

RT-PCR

RNA の抽出は RNAiso (TAKARA BIO INC.) を用いて行い、キットに付属するプロトコルに従った。抽出した RNA は DNaseI (TAKARA BIO INC.) で処理し、逆転写反応には Rever Tra Ace (TOYOBO) を使用し、プライマーは Random primers (TAKARA BIO INC.) を使用し、それぞれキットに付属するプロトコルに従った。使用したプライマーは補足資料 3 に記載した。

ノーザンブロット分析

RNA はカルスから精製したミトコンドリア画分から RNAiso を用いて抽出した。DNA プローブ作成に使用したプライマーは補足資料 3 に記載した。電気泳動には RNA を 3 µg 使用した。電気泳動、ハイブリダイゼーション、洗浄、検出は Roche 社の DIG アプリケーションマニュアルに従った。

circularized RNA RT-PCR (CR-RT-PCR)

3 細胞期の花粉を含む葯から抽出した RNA を T4 RNA Ligase (TAKARA BIO INC.) を用いて、キットに付属するプロトコルに従い環状化した。逆転写反応は SuperScriptIII (invitrogen) を用いて行い、使用した逆転写用プライマーと PCR プライマーについては補足資料 4 に記載した。得られた PCR 増幅産物は pGEM®-T Easy Vector Systems を使用してクローニングし、CEQ8000 シークエンサー (Beckman Coulter) を用いて塩基配列を決定した。

結果

ノーザンブロット分析

カルのミトコンドリア画分から抽出した RNA を用いてノーザンブロット分析を行った。検出には第 1 節で選抜した 6 つの *orf* それぞれに特異的な DNA プローブを作成して使用した。その結果, *orf340*, *orf176*, *orf83a* に特異的なプローブを用いた場合は, 明確な蓄積を検出できなかった (図 8)。 *orf276*, *orf210* に特異的なプローブを用いた場合は, RT98A と RT98C で mRNA の蓄積パターンに違いは見られなかった。 *orf113* に特異的なプローブを用いた場合には, RT98A と RT98C で mRNA の蓄積パターンに違いが検出された (図 8)。

異なる蓄積パターンを示した *orf113* については, 稔性回復遺伝子のコードするタンパク質によって転写後制御を受けていることが予測された。そのため, *orf113* を CMS 遺伝子の最有力候補として解析を優先して進めることとした。

orf113 の下流には *atp4* と *cox3* が存在していた。この領域における転写産物の蓄積パターンを推測するために, 図 9A に示すようにプローブを設計し, 再度ノーザンブロット分析を行った。その結果, *orf113* プローブで検出できた蓄積パターンの違いは, 2.1 kb と 2.2 kb のバンド, 1.1 kb と 1.2 kb のバンドの 2 種類であり, 2.1 kb と 2.2 kb のバンドは *orf113* プローブから *cox3* プローブの 5 つで検出でき, 1.1 kb と 1.2 kb のバンドは *orf113* プローブから *atp4* プローブの 3 つで検出できることがわかった (図 9B)。また, 使用したすべてのプローブで約 2.5 kb のバンドが検出されたことから, はじめに 2.5 kb の共転写が起こり, 成熟過程においてプロセッシングの違いが起きている可能性が考えられた。

RT-PCR

この領域は葯において発現しているのか, また共転写されているのかを確かめるために, RT-PCR による発現解析を行った。3 細胞期の花粉を含む葯から抽出した RNA をサンプルとして, 図 10A に示すように設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果, RT98A と RT98C の両系統において *orf113-atp4-cox3* の発現を確認することができた (図 10B)。

CR-RT-PCR

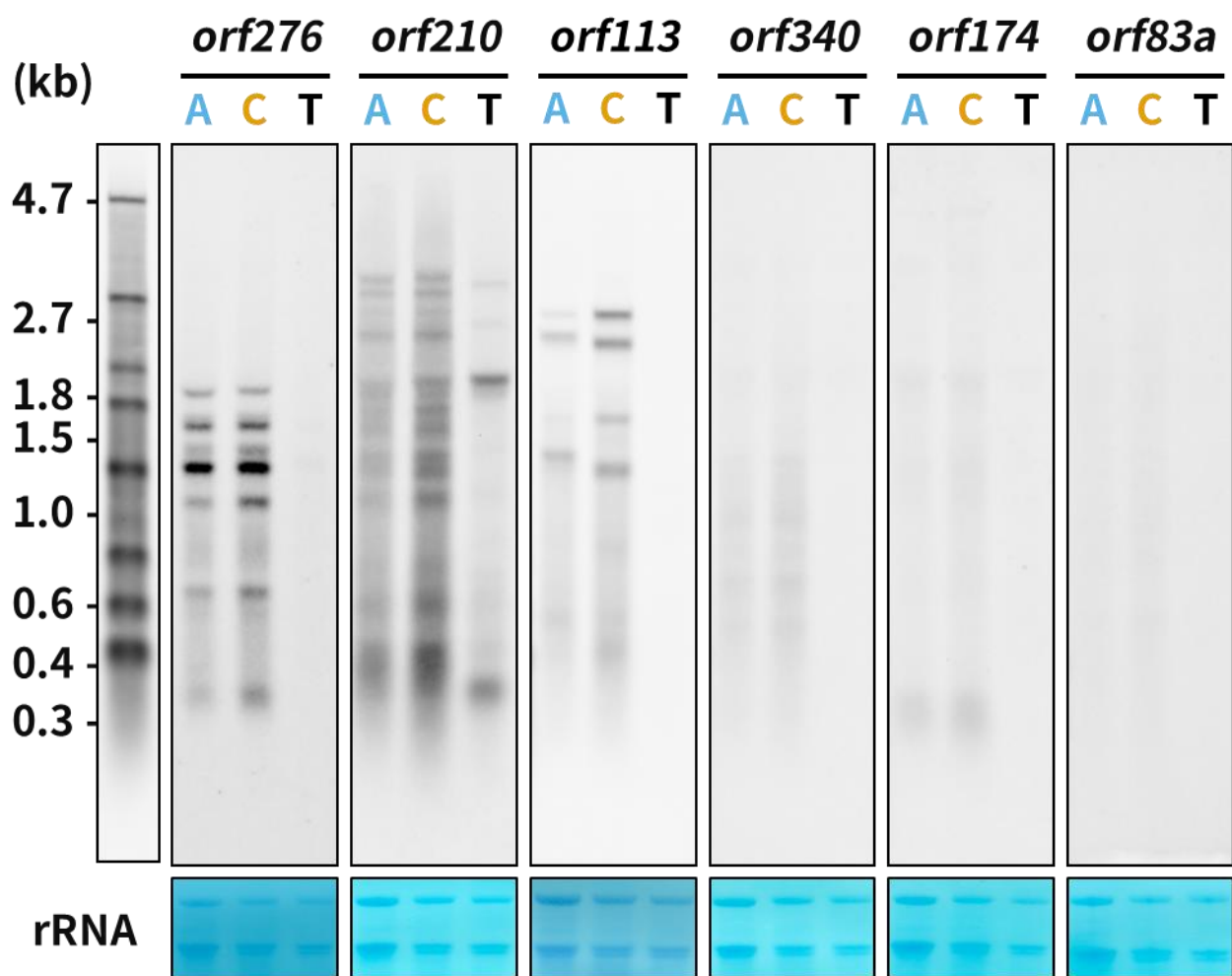


図 8 CMS 遺伝子候補 *orf* のノーザンブロット分析

A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*), T: T65 (*rfrf*)

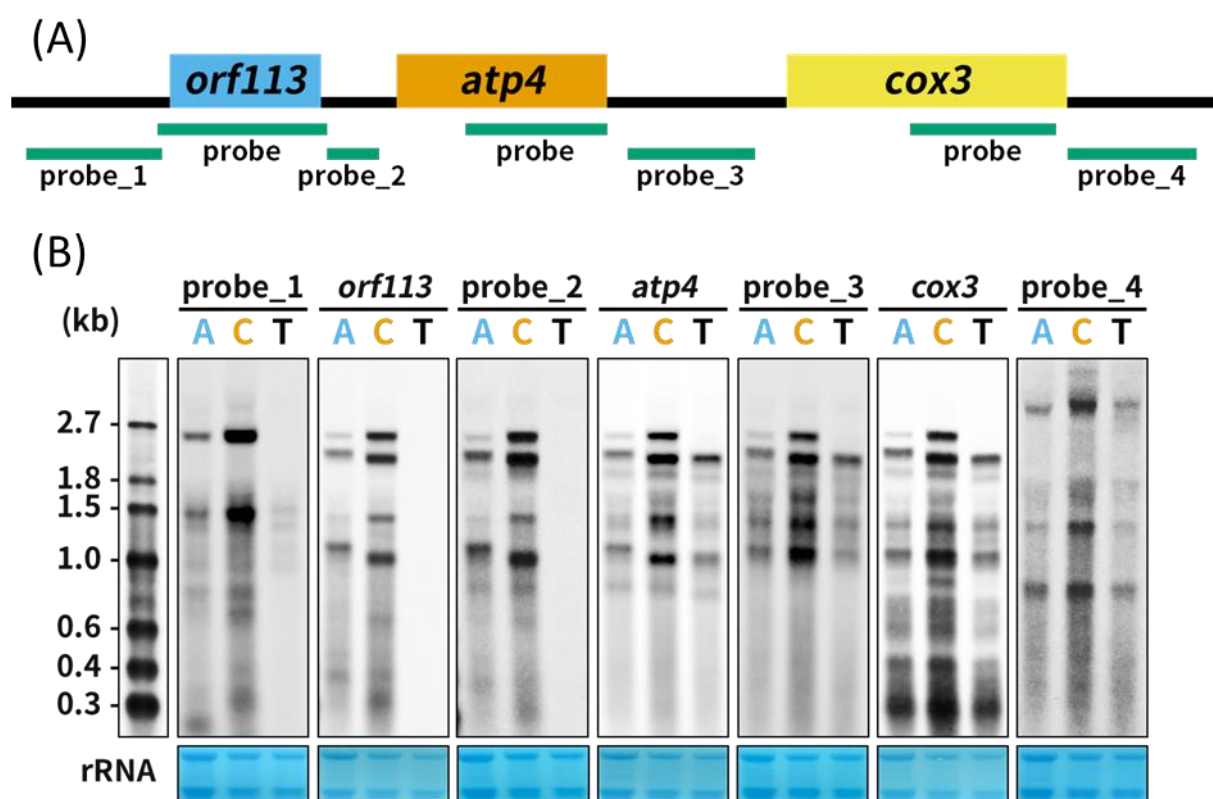


図 9 *orf113-atp4-cox3* 領域のノーザンブロット分析

(A) *orf113-atp4-cox3* 領域に作製したプローブ

(B) ノーザンブロット分析

A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*), T: T65 (*rfrf*)

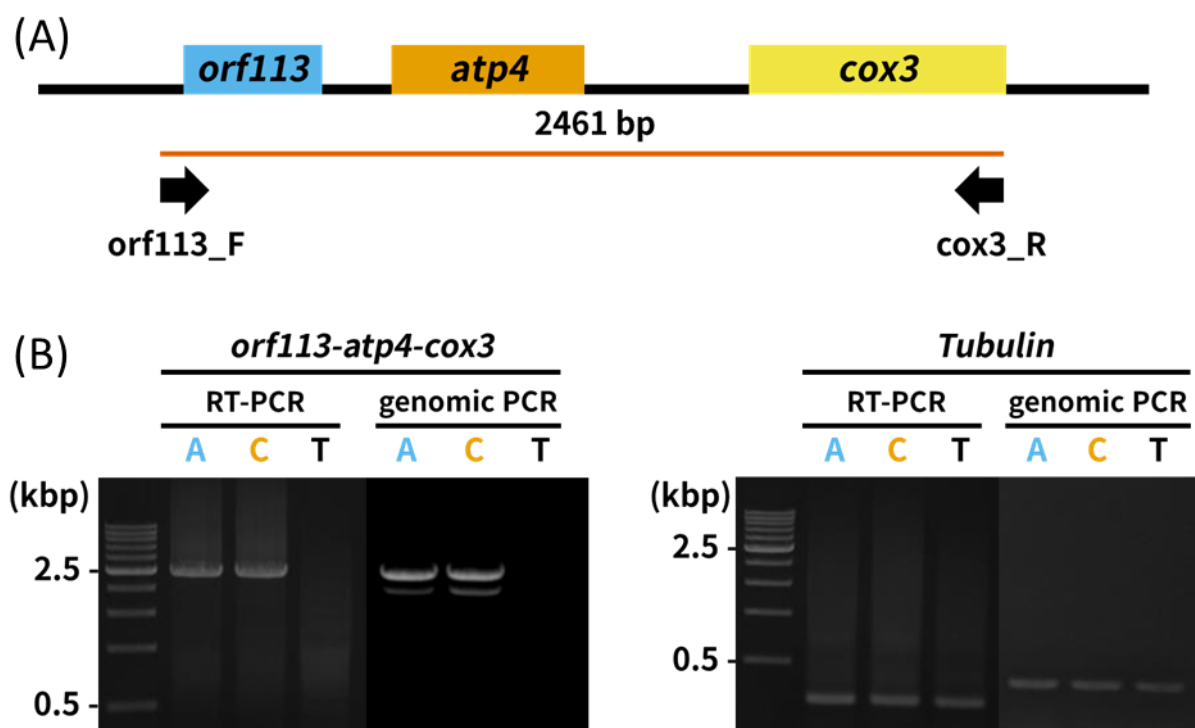


図 10 *orf113-atp4-cox3* の RT-PCR

(A) *orf113-atp4-cox3* 領域に作製したプライマー

(B) RT-PCR 産物の泳動結果

A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*), T: T65 (*rfrf*)

ノーザンブロット分析で検出された *orf113* mRNA の蓄積差について、それぞれの mRNA の 5' および 3' 末端を決定することで、なにが蓄積パターンの違いに影響しているのかを調査した。5' および 3' 末端の決定は CR-RT-PCR により調査した。図 11A のようにプライマーを設計して CR-RT-PCR を行った結果、RT98A と RT98C で異なる長さの PCR 増幅産物を得ることができた (図 11B)。これらの PCR 産物をクローニングし、シーケンス解析を行うことにより 5' および 3' 末端を決定した。その結果、3' 末端については、*cox3* および *atp4* の末端で RT98A と RT98C で同じ末端が示された (図 12A)。それに対し 5' 末端では、RT98A の末端が RT98C よりも約 50 bp 上流に存在することがわかった (図 12B)。さらに、5' 末端は RT98A と RT98C 共に *orf113* のコーディング領域内に存在していることがわかった。

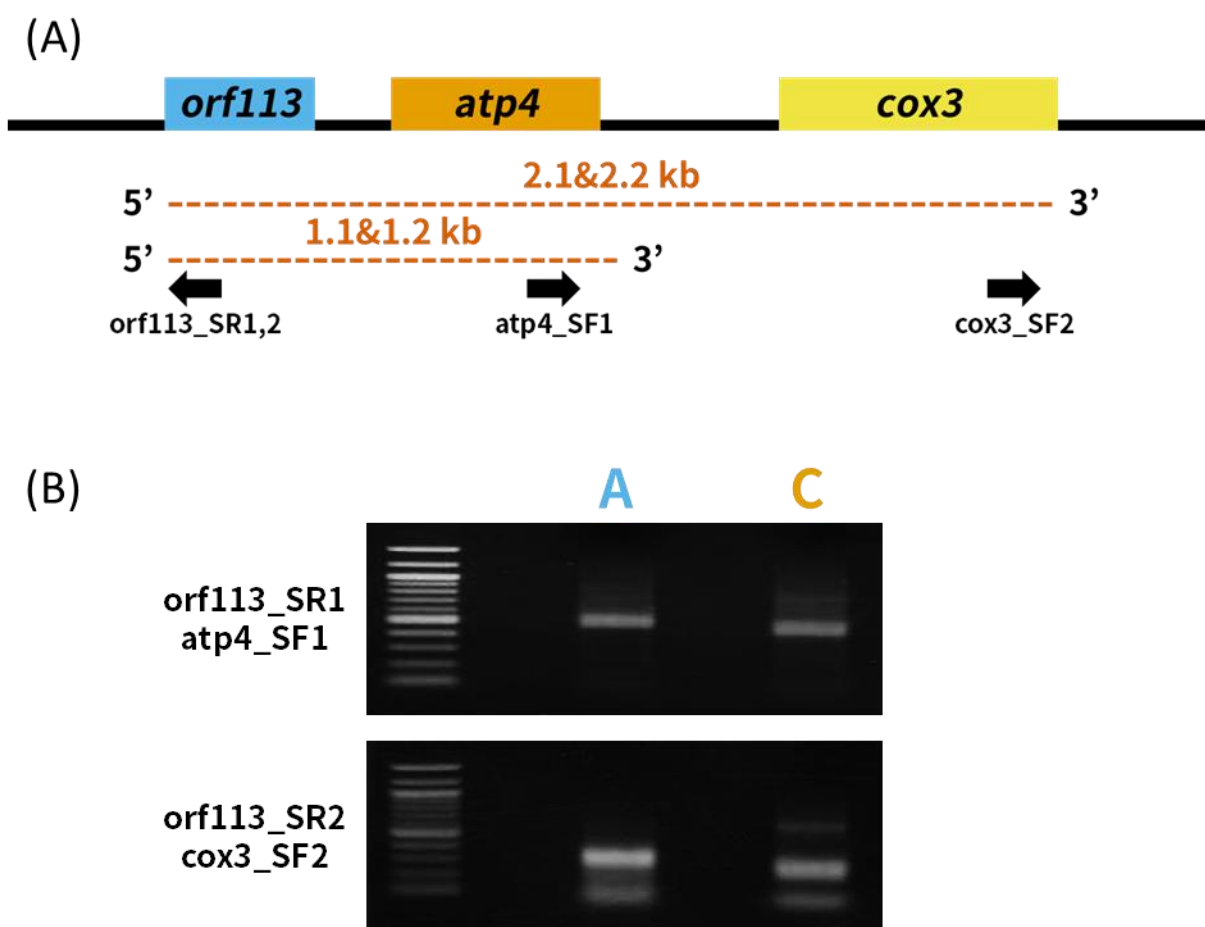


図 11 CR-RT-PCR による末端の決定

(A) 予測される転写産物の該当する領域とプライマー

(B) CR-RT-PCR の泳動図

A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*)

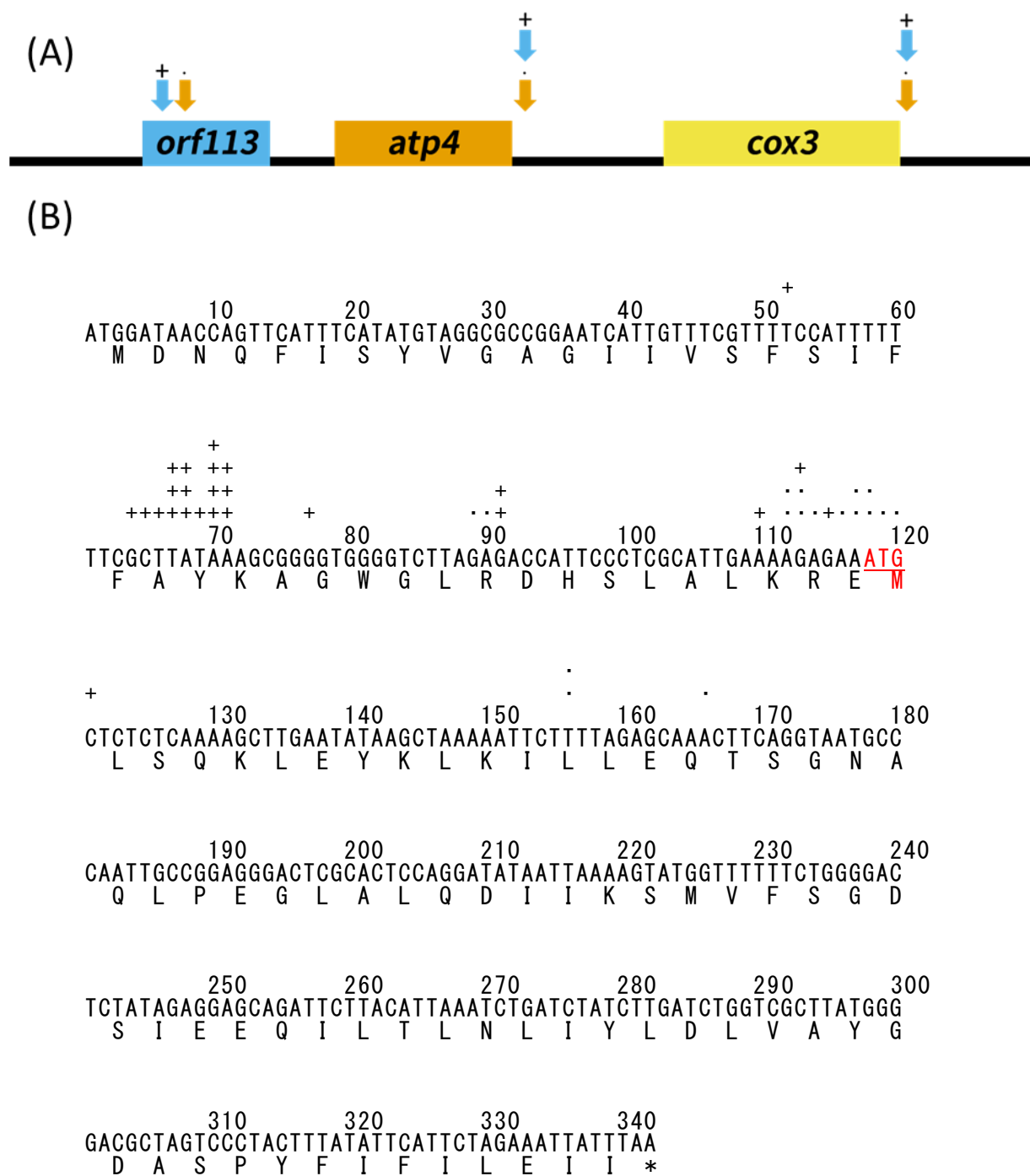


図 12 *orf113* コード領域における RT98A/RT98C の 5'末端.

(A) *orf113* を含む mRNA の転写産物の末端

(B) *orf113* 配列と mRNA 5'末端

+: 5' end of RT98A, ∙: 5' end of RT98C, *: 終止コドン. 赤字は *orf113* と同じフレームで 74 アミノ酸のペプチドの開始コドンを示す.

考察

ノーザンブロット分析の結果, mRNA の蓄積が確認できたのは *orf276*, *orf210*, *orf113* であった. また, *orf113* については RT98A と RT98C の間で mRNA の蓄積パターンに違いが検出された. この結果から, 転写後制御が行われている CMS 遺伝子の候補として *orf113* が該当することが考えられた. また, *orf276* と *orf210* は, 転写後制御が行われていないものの, 翻訳制御や翻訳後制御が行われている可能性が考えられた.

orf113 mRNA の蓄積パターンの違いをもたらしているのは, 5'末端の違いであった. *orf113-atp4-cox3* は 2.5 kb の共転写産物が蓄積していたことから, はじめに 2.5 kb の共転写が行われ, その後の成熟過程で RT98C においてプロセッシングが起こることで, 5'末端が短くなっているのではないかと考えられた. これまでの報告において, CMS 遺伝子の mRNA の切断が示されているのは, イネ BT-CMS の B-*atp6-orf79* に対する *Rf1a*, HL-CMS の *atp6-orfH79* に対する *Rf5* と *Rf6*, LD-CMS の L-*atp6-orf79* に対する *Rf1a*, WA-CMS の WA352 に対する *Rf4* である (Kazama *et al.* 2008, Itabashi *et al.* 2009, Hu *et al.* 2012, Kazama and Toriyama 2014, Huang *et al.* 2015). これらのクローニングされた稔性回復遺伝子は全て P タイプの PPR タンパク質をコードしている. クローニングした *Rf98* も P タイプの PPR タンパク質をコードしているため, *orf113-atp4-cox3* mRNA の転写後制御に関与している可能性が考えられた. この可能性については, 第 4 章で検証を行う.

orf113 を含む 2 kb と 1 kb の mRNA の 5'末端ははじめに想定したコーディング領域の内部に存在していた (図 12B). mRNA の切断によって CMS タンパク質の蓄積に影響するモデルを想定した場合, 5'末端よりも下流から翻訳が行われると考えられる. その場合, *orf113* と同じフレームで 74 アミノ酸のペプチドが翻訳可能ではないかと考えられる. この可能性については, 第 3 節のタンパク質解析において考慮する必要がある. なお, *orf113* を含む mRNA は 2.6 kb の長さの mRNA も存在し (図 9A), その mRNA からは 113 アミノ酸の ORF113 が翻訳可能である.

orf113 から翻訳される 74 アミノ酸のペプチドは, 膜貫通領域をコードせず, 既知のミトコンドリア遺伝子と相同性を示す領域も持たない. そのため, 本研

究の方針では三段階目の選抜の対象にならず，上流の配列によっては見落とし
ていた可能性もある．この問題点，本研究で行った *orf* の選抜方法については
総合考察で検討を行う．

orf113 が転写後制御を受けている可能性が見出されたこと，稔性回復遺伝子
Rf98 が P タイプの PPR タンパク質をコードしていることから，*orf113* が CMS
遺伝子の最有力候補と考えられた．そのため，第 3 節では *orf113* がコードする
タンパク質についての解析を行った．

第3節 CMS 遺伝子候補 *orf113* のタンパク質解析

方法

リコンビナントタンパク質の合成

6×His タグを付加した発現コンストラクトを、TMHMM 解析から推定される膜貫通領域を参考に設計した。発現ベクターの構築に使用したプライマーは補足資料5に記載した。発現ベクター構築には pQE-30 を使用し、タンパク質発現用大腸菌 M15 に導入した。発現コンストラクトを導入した大腸菌は、1×LB 液体培地 (0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) polypeptone, 1% (w/v) NaCl) で培養し、IPTG (終濃度 1 mM) で誘導後、16°C で 6 時間培養した。回収した大腸菌のペレットに対し、培養液の 1/20 量の lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH8.0) に懸濁し、lysis buffer の 1/50 量のリゾチーム溶液 (10 mg/ml lysozyme in 20 mM Tris-HCl, pH8.0) を添加して氷上で穏やかに 30 分間撹拌した。lysis buffer の 1/50~1/10 量の 10% (w/v) Triton X-100 を加え、4°C で 20 分間撹拌した。wash buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, 20 mM imidazole, pH8.0) を lysis buffer の 10 倍量加え、1 時間以上室温で穏やかに撹拌した。その後、4°C, 9,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。氷水中で冷やしながら超音波破碎 (TOMY UD-201, φ 3.2, 強度: 2, Duty: 50, 1 min 程度) を溶液の粘性がなくなるまで行った。室温, 9,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を回収後、Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を加えて室温で 60~120 分間穏やかに撹拌した。室温, 9,000×g で 1 分間遠心分離し、上清を取り除き、wash buffer で洗浄した illustra™ MicroSpin™ Columns (GE Healthcare) に Ni-NTA 液を滴下し、wash buffer で洗浄後、elution buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, 300 mM imidazole, pH8.0) で溶出した。

リコンビナントタンパク質の毒性試験

リコンビナントタンパク質発現コンストラクトを導入した大腸菌を 1×LB 液体培地で培養し、OD₆₀₀=0.5 に調整した。1 M IPTG を塗布した 1×LB 培地で 37°C, 一晚培養し、大腸菌の増殖を観察した。また、終濃度 1 mM の 1×LB 液体培地で培養し、30 分毎に OD₆₀₀ を計測した。

ウェスタンブロット分析

サンプル 50 μg に対して 50 μL の lysis solution (100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1% (w/v) SDS and 0.1% (w/v) Triton X-100, pH 8.0) に溶かし, 12,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離し, 上清を回収した. 回収した上清は 2 \times loading buffer (100 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 0.01% (w/v) bromophenol blue and 30% (w/v) glycerol, pH 6.8) を加えて電気泳動した. 12% (w/v) Tris/Tricine SDS-PAGE で電気泳動を行い, Immobilon-P (Millipore) にブロッキングした. 一次抗体は anti-isocitrate dehydrogenase (希釈倍率 1:5000; Agrisera, <http://www.agrisera.com/>), anti-RT98_ORF74 (ペプチド抗体, 配列: C+MLSQKLEYKLKI, 希釈倍率 1:5000), anti-His-ORF74 (ポリクローナル抗体, 希釈倍率 1:5000) を使用した. 二次抗体は anti-mouse IgG (Fc) alkaline phosphatase conjugate (希釈倍率 1:5000; Promega, <http://www.promega.com/>) または anti-rabbit IgG (Fc) alkaline phosphatase conjugate (希釈倍率 1:5000; Promega) を用いた. メンブレンを AP9.5 buffer (100 mM Tris-HCl (pH9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) で洗浄後, NBT/BCIP 混合液 (173 mM NBT, 115.3 mM BCIP, 100 mM Tris-HCl (pH9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) で検出した.

結果

ORF113 の TMHMM 解析の結果，大腸菌に対する毒性試験用に設計したタンパク質の領域およびウェスタンブロット分析に用いた抗体の抗原部位を図 13A に示した．

ORF113 の大腸菌に対する毒性試験

膜貫通領域を含む全長 ORF113 を発現誘導すると，固形培地および液体培養における大腸菌の増殖が阻害された（図 13B, C）．全長 ORF113 を発現誘導しない場合，および膜貫通領域を除いた Δ ORF113 を誘導した場合は，大腸菌は正常に増殖した．

ウェスタンブロット分析

カルスおよび 3 細胞期の花粉を含む葯から抽出したタンパク質をサンプルとしてウェスタンブロット分析を行い，ORF113 の検出を試みた．ORF113 が翻訳するペプチドは，113 アミノ酸の場合は 12.7 kDa，74 アミノ酸の場合は 8.3 kDa であると予測される．ポリクローナル抗体 anti-His-ORF74 は，ORF113 が翻訳する 74 アミノ酸のタンパク質を抗原として作製した．ペプチド抗体 anti-RT98_ORF74 およびポリクローナル抗体 anti-His-ORF74 を用いて検出を行った結果，予測よりも大きいサイズのバンドが多数検出されたが，RT98A と RT98C の間に蓄積パターンの違いは検出されず，また T65 との違いは検出されなかった（図 14）．そのため，非特異的なバンドが検出されたものと判断された．

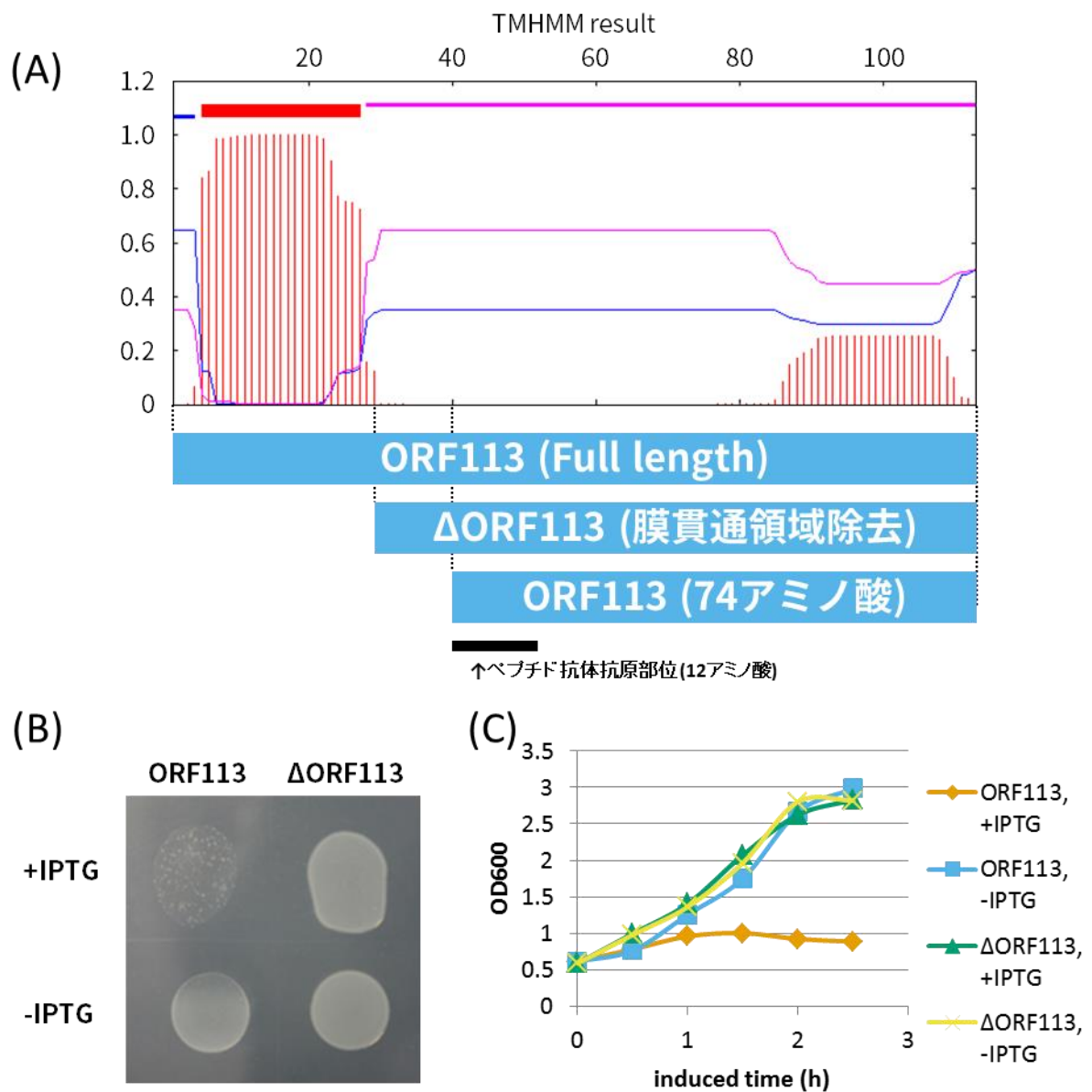


図 13 ORF113 の大腸菌に対する毒性試験

(A) ORF113, ΔORF113, ORF113 (74 アミノ酸) およびペプチド抗原の該当領域

(B) 固形培地における毒性試験

(C) 液体培養における毒性試験

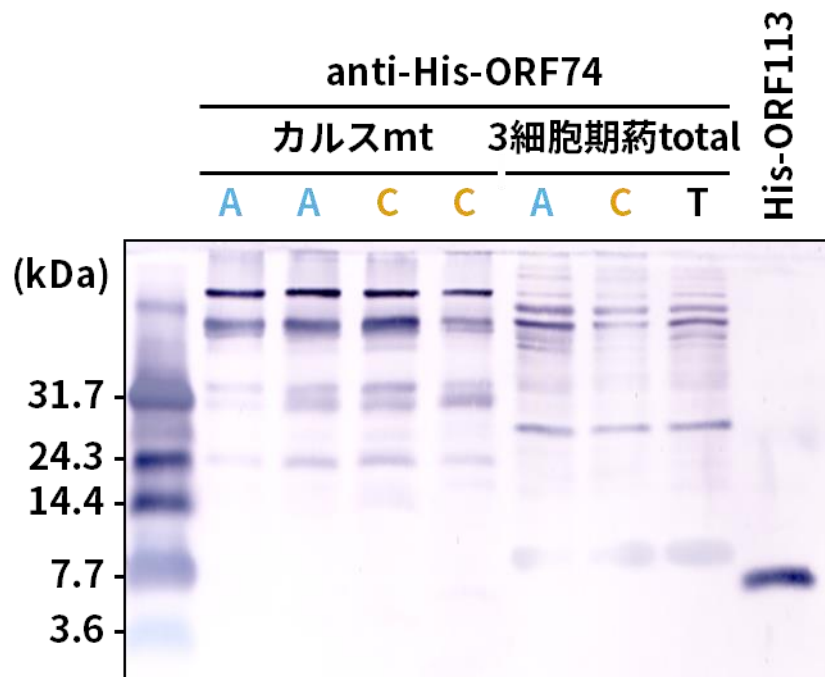
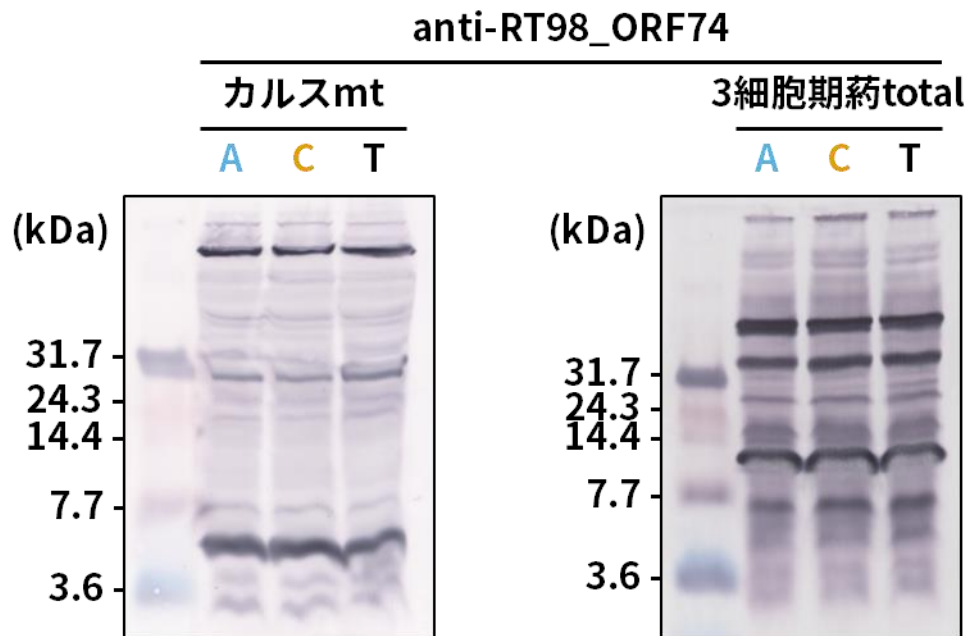


図 14 ORF113 のウェスタンブロット分析

A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*), T: T65 (*rfrf*)

考察

膜貫通領域を含む ORF113 は大腸菌に対する毒性を示した。このことから、ORF113 は発現すればミトコンドリアの機能を低下させ、雄性不稔を引き起こす可能性があると考えられる。これまでに CMS 遺伝子で大腸菌に対する細胞毒性が示されたのは、BT-CMS の ORF79 (Wang *et al.* 2006)、ヒマワリ CMS-PET1 の ORFH522 (Nakai *et al.* 1995)、アブラナ Ogura-CMS の ORF138 (Duroc *et al.* 2005)、Hau-CMS の ORF288 (Jing *et al.* 2011)、トウガラシ CMS-Peterson の ORF507 (Li *et al.* 2013) などが挙げられる。ORF79 は、C 末端の 5 アミノ酸が毒性を示すことが報告されている (Wang *et al.* 2006)。この領域は膜貫通領域ではなく、また COX1 との相同性のある配列でもない。CMS-Peterson の ORF507 は、N 末端が最も細胞毒性を示し、また ATP6 との結合も強かった。一方、ORF138 は膜貫通領域が毒性に関与することが示されている。そのため、必ずしも膜貫通領域が毒性に関与するわけではないことがわかる。ORF113 と同じく膜貫通領域が毒性に関与すると考えられる Ogura-CMS の ORF138 は、pore を形成するタイプの雄性不稔機構が考えられており、対して ORF79 と相同性の高いイネ HL-CMS の ORFH79 では呼吸鎖複合体に結合するタイプの雄性不稔機構が考えられている。雄性不稔機構のタイプと細胞毒性に関与する配列の関係性については不明であるが、膜貫通領域がなければ細胞毒性を示さないタイプは呼吸鎖複合体と相互作用せず、ホモオリゴマーを膜で形成して毒性を示すとも考えることもできる。

ウェスタンブロットによる ORF113 タンパク質の検出では、RT98A に特異的なバンドは検出できなかったため、ORF113 を検出することができなかった。第 2 節では *orf113* のプロセッシングによる転写後制御の可能性を考察したが、その場合は RT98A と RT98C で蓄積パターンが異なることになると考えられる。そのため、今回の結果からは証明することができなかった。抗体によるタンパク質の検出では、抗体の検出能力が低い場合は検出できず、新しい抗体での検出を試みることで検出できるようになることがある (Kazama *et al.* 2016)。そのため、必ずしも蓄積していないとは断言することはできない。

第 4 章 稔性回復遺伝子 *Rf98* と CMS 遺伝子の相互作用

同定した稔性回復遺伝子 *Rf98* と、選抜した CMS 遺伝子候補 *orf113* の相互作用について検証を行う。*Rf98* は P タイプの PPR タンパク質をコードしており、RNA のプロセッシング、スプライシング、分解、翻訳の制御に関与することが予測される。また、*orf113* は稔性回復系統ではプロセッシングによる転写後制御を受けている。本章では *Rf98* のマッピングで得た組換え個体および形質転換体を用いたノーザンブロット分析により相互作用を検証し、*orf113* が CMS 遺伝子として妥当であるかどうか考察した。

結果

orf113 のプロセッシングに関与する因子を明らかにするために、*Rf98* マッピングの過程で得られた組換え個体 R1 から R8 について *orf113* のプロセッシングを調査することにした。はじめに R1 から R8 についてカルスのミトコンドリア RNA を用いてノーザンブロットを行ったところ、*orf113* mRNA の蓄積パターンが RT98A タイプと RT98C タイプが混在し、マッピングと矛盾する結果となった (補足資料 6A)。この理由を明らかにするために、使用した個体のジェノタイピングを行った結果、RT98C 由来のゲノムをヘテロで持っている場合に RT98A と同じバンドパターンを示す可能性が示唆された (補足資料 6B)。これを確かめるために、RT98C×T65 F₁ について *orf113* プローブを用いたノーザンブロットを行った結果、RT98A と同じバンドパターンを示すことがわかった (図 15A)。その後、組換え個体 R1 から R8 について、RT98C 由来のゲノムをホモに持つ個体を選抜し、再度ノーザンブロット分析を行った結果、組換え個体 R1 から R8 では、すべて RT98C と同じ蓄積パターンが検出された (図 15B)。

次に、稔性回復遺伝子 *Rf98* として同定した *PPR762* を導入した形質転換体のうち、最も稔実率の高かった #18 と #23 に稔った T₁ 種子から誘導したカルスのミトコンドリア RNA をサンプルとしてノーザンブロット分析を行った。その結果、*PPR762* を導入した個体では、RT98A と同じ蓄積パターンが検出された (図 16)。この結果から、*PPR762* は *orf113* のプロセッシングに関与しないことが考えられた。

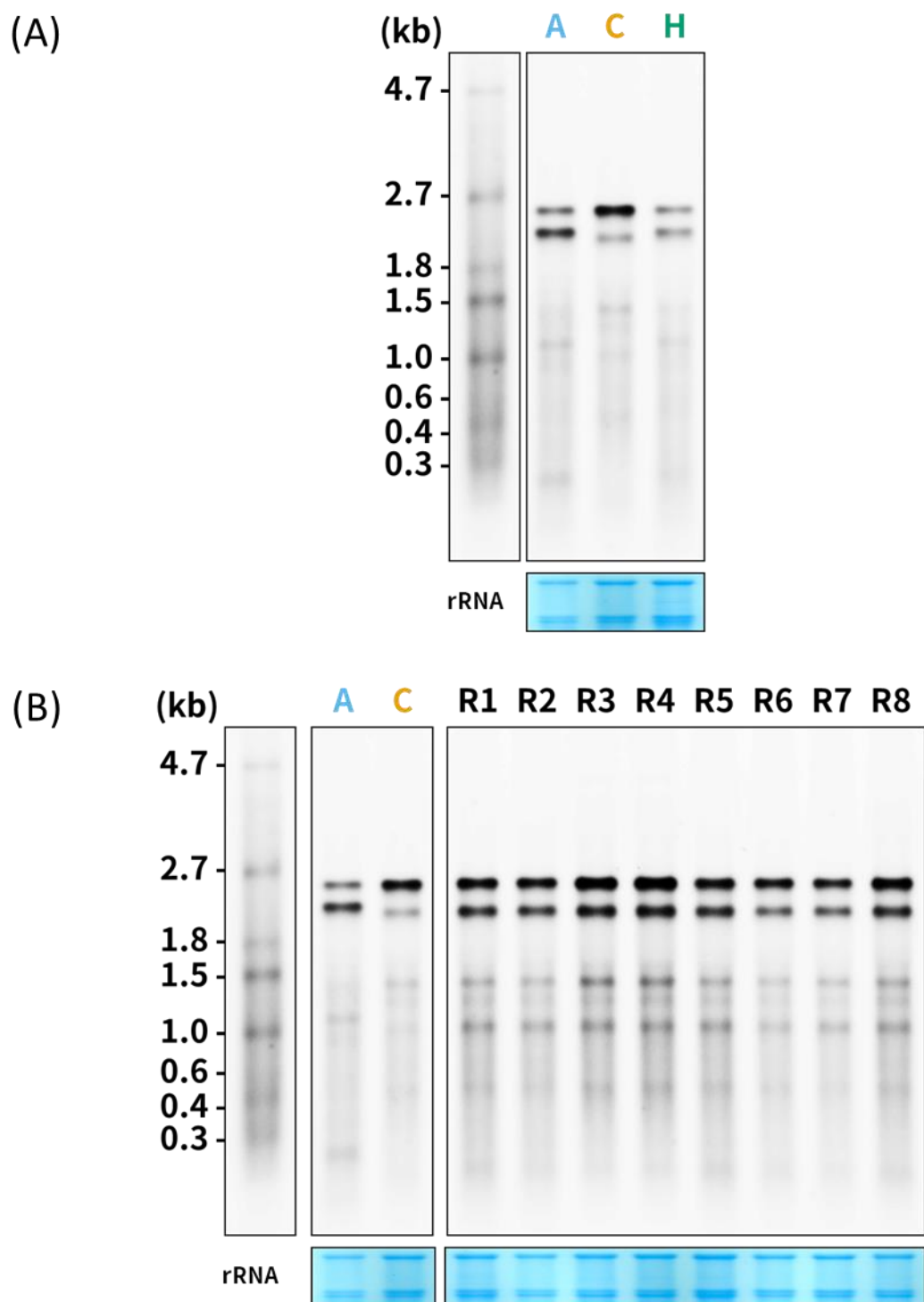


図 15 RT98C×T65 F₁ および組換え個体の *orf113* ノーザンブロット分析

(A) RT98C×T65 F₁ を用いたノーザンブロット分析

(B) 組換え個体を用いたノーザンブロット分析

A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*), H: RT98C×T65 F₁ (*Rfrf*)

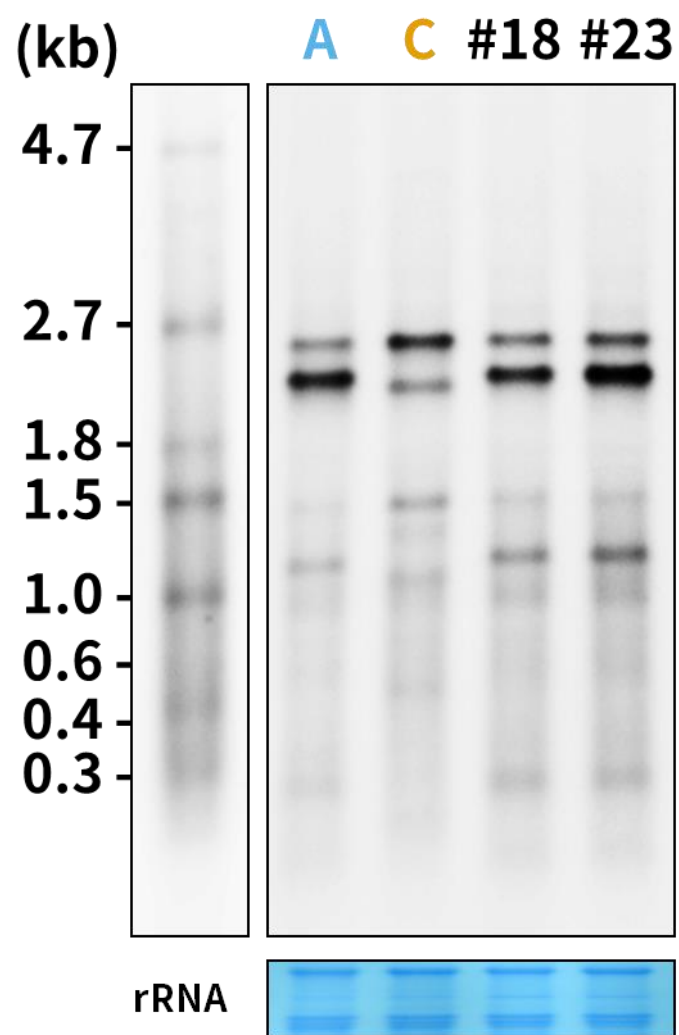


図 16 PPR762 導入形質転換体の *orf113* ノーザンブロット分析

A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*), #18 および #23: PPR762 導入個体 T₁

考察

第3章、第2節のCR-RT-PCRの結果から、*orf113* mRNAの5'末端は、RT98CよりもRT98Aの方が約50 bp上流に存在していることが明らかとなった。図15Aの結果から、RT98C×T65 F₁では*orf113*のmRNAはRT98Aと同じ蓄積パターンを示した。このことから、T65由来のゲノムには*orf113* mRNAのプロセッシングが起こる位置を約50 bp上流に変える働きを持つ遺伝子が存在することが考えられた。また図15Bの結果から、組換え個体R1からR8のホモ個体ではRT98Cと同じ蓄積パターンを示したため、*orf113*のプロセッシングを制御している遺伝子は、T65の*Rf98*候補領域に相当する領域にコードされることがわかった。この領域にはPPR遺伝子がコードされていることが予測されるが、日本晴とT65で同一のPPR遺伝子が保存されているとは限らない。またDDBJ Sequence Read Archive (<http://trace.ddbj.nig.ac.jp/dra/index.html>)などに登録されているT65の次世代シーケンスのデータから、繰り返し配列を持つPPR遺伝子の配列を解読することは難しい。そのため、T65のこの領域にコードされる遺伝子を推定することができず、*orf113* mRNAのプロセッシングに関与する遺伝子は不明である。

第2章では同定した稔性回復遺伝子*Rf98*は稔性回復作用が弱く、その理由は稔性回復補助遺伝子が欠損していることであると考察した。また稔性回復遺伝子*Rf98*の相補性試験で、*PPR762*導入個体は組換え個体R3やR4に相当する稔実率を示したため、*Rf98*候補領域において稔性に関与する遺伝子は*PPR762*のみであると考察した。

*PPR762*を導入した形質転換体は、T65にコードされる*orf113* mRNAのプロセッシングに関与する遺伝子をホモで保持していると考えられる。図16では、*PPR762*を導入した形質転換体において*orf113* mRNAのプロセッシングが起きていないことが確認された。これらの結果から、*PPR762*が*orf113* mRNAのプロセッシングに関与しないこと、および*orf113* mRNAのプロセッシングの有無が稔性に関与しないことが裏付けられた。

本研究では、第2章で稔性回復遺伝子を同定している。興味深いことに、マッピングで絞り込んだ*Rf98*候補領域に相当するT65由来のゲノムには*orf113* mRNAのプロセッシングを制御するタンパク質をコードしている遺伝子が存在

していることが明らかとなった。この領域に存在する遺伝子は不明であるが、日本晴の *Rf98* 候補領域には、機能が欠損したと考えられる PPR 遺伝子として、*PPR267* (*Os10g0497432*) および *PPR402* (*Os10g0497366*) が存在している。PPR 遺伝子は進化の過程でゲノムの重複により拡大し、機能の獲得や欠損が起こったと考えられており、特に Rf 様 PPR (Rf like PPR) 遺伝子クラスターはイネにおいては第 10 染色体に存在する (Geddy and Brown 2007, O'Toole *et al.* 2008). そのため、今回の結果からは、T65 のこの領域にコードされる PPR タンパク質が、偶然 *orf113* mRNA のプロセッシングに関与するものであったため、この遺伝子による作用は CMS とは無関係であったという可能性が考えられる。

orf113 のプロセッシングには *PPR762* が作用しないこと、またプロセッシング自体も稔性とは関係しないことが明らかとなったことから、RT98-CMS の CMS 遺伝子として *orf113* が最有力候補とは考えられなくなった。しかし、*orf113* を含む 2.7 kb の mRNA からは *orf113* の翻訳が可能であり、稔性回復遺伝子または稔性回復補助遺伝子により ORF113 の蓄積の有無が変化する可能性もある。このことから、RT98-CMS の CMS 遺伝子の候補は *orf276*, *orf210*, *orf113* の 3 つであり、これらについては翻訳制御または翻訳後制御を受けている可能性が考えられる。これらの候補から CMS 遺伝子を見出すためには、それぞれの遺伝子から翻訳されるタンパク質を検出するため、今後、力価の高い抗体を作成して検証を行う必要がある。

総合考察

本研究では、RT98-CMS の稔性回復遺伝子 *Rf98* を *PPR762* と同定し、その実体が P タイプの PPR タンパク質をコードしていることを明らかにした。また、*PPR762* は弱い稔性回復作用を持ち、稔性の完全な回復には稔性回復補助遺伝子の存在が必要であることを示した。また CMS 遺伝子について、RT98 細胞質が持つミトコンドリアゲノムの配列を決定し、その中から 3 つの *orf* (*orf276*, *orf210*, *orf113*) を CMS 遺伝子の有力な候補として見出した。さらに、*orf113* は T65 が第 10 染色体の *Rf98* 座乗領域近傍に持つ遺伝子のコードするタンパク質によりプロセッシングの阻害を受けること、そのプロセッシングは雄性不稔とは無関係であることを明らかにした。これらの結果から、RT98-CMS の稔性回復機構および雄性不稔機構について考察する。

Rf98 は P タイプの PPR タンパク質をコードしているため、その機能は RNA のプロセッシング、スプライシング、分解、翻訳の制御であると考えられる。CMS 遺伝子の候補とした 3 つの *orf* のうち、*orf113* の mRNA は RT98A と RT98C で蓄積パターンに違いがあったが、RT98A と *PPR762* を導入した形質転換個体では蓄積パターンに違いが無かった。また、*orf276* と *orf210* の mRNA の蓄積パターンに違いは無かった。そのため、これら 3 つの *orf* に CMS 遺伝子が存在する場合、*PPR762* が持つ稔性回復機構は翻訳制御であると考えられる。

CMS 遺伝子として見出した 3 つの *orf* は、それぞれが既知のミトコンドリア遺伝子とのキメラ構造をとっていた (図 17)。このうち、*orf113* については大腸菌に対する毒性を持つことが明らかとなった。膜貫通領域を保持していないと毒性を持たないため、ORF113 はミトコンドリア膜に蓄積して pore の形成による雄性不稔機構を持つことが考えられた。*orf276* はイネ WA-CMS の CMS 遺伝子 WA352 から翻訳される WA352 が COX11 と相互作用することが示された配列と相同性の高い配列を保持している。そのため、ORF276 は WA352 と同じく COX11 と相互作用し、呼吸鎖複合体に結合するタイプの雄性不稔機構を持ちうると考えられる。*orf210* は CW-CMS の CMS 遺伝子 *CW-orf307* と相同性の高い配列を保持する。しかしながら、*CW-orf307* による雄性不稔機構は明らかとなっていない。膜貫通領域をコードしないため、ミトコンドリア膜に蓄積して単体で pore を形成するとは考えにくい。このことから、呼吸鎖複合体に結合して機能

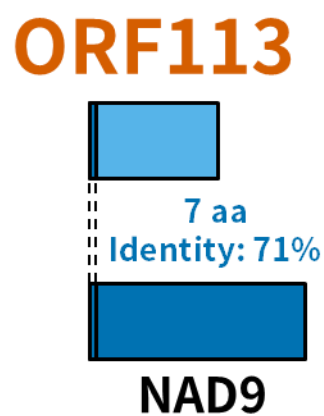
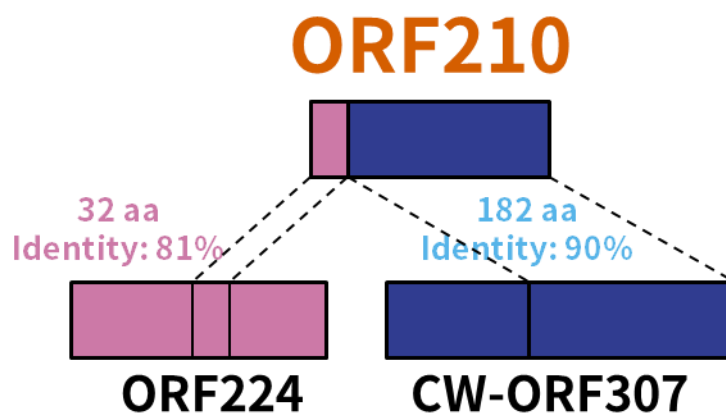
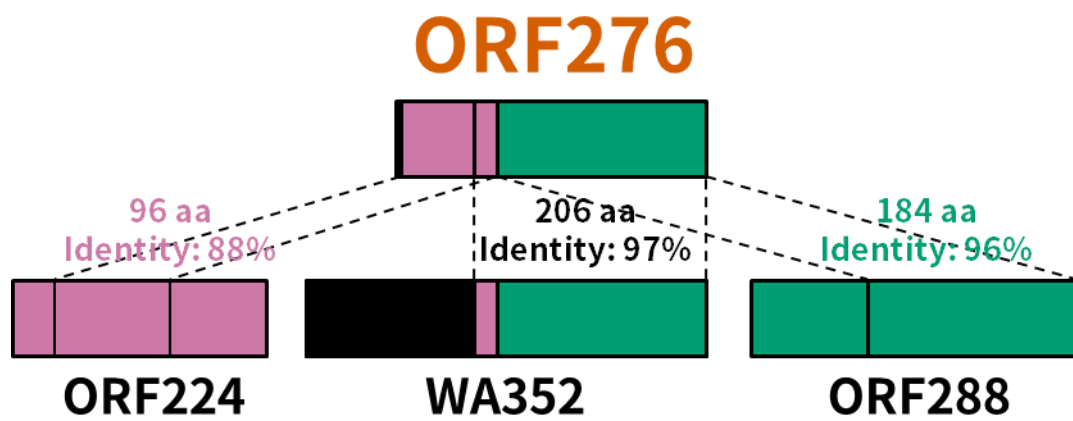


図 17 ORF276, ORF210, ORF113 のキメラ構造

を阻害する可能性があると考えられる。

本研究では、これまでの CMS 研究における問題点を見出すことができた。まず、CMS 細胞質が保持するミトコンドリアに特異的な *orf* の転写後制御に関与する遺伝子が、維持系統にコードされる可能性を見出した。RT98-CMS の *orf113* の場合は、維持系統である T65 由来の因子による転写後制御が雄性不稔に影響しないことが、稔性回復遺伝子として同定した *PPR762* を導入して稔性が回復した形質転換個体を用いたノーザンブロット分析により証明することができた。この結果は、転写後制御を受けている *orf* には稔性回復遺伝子とは関係のないものが存在することを示す。その可能性を見抜くために、CMS 遺伝子の mRNA 蓄積パターンを調査する場合には、CMS 系統、稔性回復系統、F₁ 系統を同時に比較し、制御因子が母本または父本のどちらにコードされているのかを示すべきである。

次に、稔性回復遺伝子の近傍に稔性回復補助遺伝子が存在する可能性を見出したことが挙げられる。RT98-CMS については、従来の交配実験では単一座の遺伝子による制御だと考えられていたが、実際には 2 つ以上の遺伝子が関与していることを明らかにすることができた。本研究におけるマッピングでは、想定した *Rf98* についてヘテロの系統の自殖後代から組換え個体を選抜することでマッピングを行った。しかしながら、この戦略では雄性不稔を制御する遺伝子が近い領域に複数存在する場合、組換えが起きた花粉が後代に遺伝しにくいために、候補領域が狭まりにくい現象が起こることが考えられる。これを回避するためには、雄性不稔に関与する遺伝子の遺伝に影響の無い母親側で組換えが起きた個体からも組換え個体を選抜し、その個体の自殖後代または維持系統を交配した後代について、稔実率を調査するという戦略が考えられる。もしくは、CMS 遺伝子を持たない T65 において、RT98C の染色体断片置換系統群 (chromosome segment substitution lines: CSSL) を育成し、RT98A に交雑した後代で稔実率を調査する戦略が考えられる。

最後に、今後 RT98-CMS の稔性回復機構と雄性不稔機構の全貌解明ための方針を考察する。最優先すべきは稔性回復補助遺伝子の同定である。本研究で同定した稔性回復遺伝子 *Rf98* は稔性回復能力が低いことが示されたが、その理由については不明であり、現時点では稔性回復補助遺伝子と相互作用しなけれ

ば CMS 遺伝子を完全に制御することができない可能性と、複数の CMS 遺伝子が存在しており、稔性回復遺伝子と稔性回復補助遺伝子それぞれが制御している可能性が考えられる。前者の場合、イネ HL-CMS の RF5 と GRP162 または RF6 と OsH XK6 のように RF98 と相互作用する因子をスクリーニングすることで見出すことができると考えられる。しかしながら、後者であった場合は稔性回復補助遺伝子にコードされるタンパク質は RF98 と相互作用しないと考えられるため、この戦略では見出すことができない。そのため、マッピングによって稔性回復補助遺伝子の候補領域を狭める必要がある。しかしながら稔性回復遺伝子と稔性回復補助遺伝子の間で組換えが起きた染色体は CMS 細胞質では稔性の低下をもたらすため、前述したように T65 細胞質を持つ RT98C の CSSL を育成する戦略をとる必要がある。

CMS 遺伝子の候補となる *orf* は現時点で 3 つに絞られている。まずはこれらの *orf* から翻訳されるタンパク質を検出できる抗体を作製する必要がある。その際、翻訳後制御による稔性回復機構の可能性を考慮し、通常細胞質を持つ T65 と比較する。もし稔性回復補助遺伝子が PPR タンパク質または RF98 と相互作用するタンパク質をコードしていることが明らかであれば、CMS 遺伝子は転写後制御または翻訳制御を受けていることが予測できるため、翻訳後制御の可能性を除外できる。逆に、RT98A と RT98C にのみ蓄積するタンパク質を検出できた場合、稔性回復補助遺伝子の候補から PPR 遺伝子の優先度を下げることができると考えられる。

近年、次世代シーケンサーによる解析でミトコンドリアゲノムを決定することが可能となり、これまで見出すことのできなかった CMS 特異的な *orf* を多数見出すことができるようになった。本研究ではこれまでに見出されてきた CMS 遺伝子の特徴であるキメラ構造と膜貫通領域の保持という条件で CMS 遺伝子候補の選抜を行った。しかしながら、CMS 遺伝子の雄性不稔機構が明らかになるにつれ、CMS 遺伝子の配列的な特徴からは予測されにくいメカニズムで働いていることがわかってきた。イネ BT-CMS の *orf79* は complex IV のサブユニットをコードする *cox1* とのキメラ構造をとっているが、大腸菌に対する毒性に重要なのは由来不明の C 末端配列であった (Wang *et al.* 2006)。また、イネ HL-CMS の *orfH79* も *cox1* とのキメラ構造をとるが、相互作用が示されたのは

complex IIIのサブユニットをコードする P61 である (Wang *et al.* 2013). ホモオリゴマーとなり pore を形成することが明らかとなった Ogura-CMS の *orf138* は、既知のミトコンドリア遺伝子とのキメラ構造を持たない (Duroc *et al.* 2005). これらの報告からも、配列的特徴から機能を推定することは未だ困難であることがわかる. ただし, CMS 遺伝子は少なくともタペート組織や花粉において発現しなければならないため, それらの組織において発現していることを条件に選抜することは有効であると考えられる. 花粉 (葯) からミトコンドリアを精製するのは困難なため, 本研究ではカルスから精製したミトコンドリアを用いて発現を調査した. 今後, 花粉からミトコンドリアを精製する手法開発が望まれる. CMS 遺伝子の特徴に周辺配列との共転写が挙げられることから, ミトコンドリアゲノムの組換えにより本来転写されない領域が転写されるようになることが CMS 遺伝子となる条件であり, 既知のミトコンドリア配列とのキメラ構造は結果的に生じた特徴なのかもしれない. 実際に, RT98-CMS では膜貫通領域を含むという特徴で選抜してきた *orf340*, *orf174*, *orf83a* は発現がほとんど検出されなかった. そのため, 今後は予測された周辺配列の組換えを含めた選抜や, RNA-seq による発現解析から CMS 遺伝子の候補を選抜するべきだと考えられた.

結語

細胞質雄性不稔性は一代雑種育種に利用されており，また核-ミトコンドリア相互作用の研究にも有用な性質である．本研究では，RT98-CMS の稔性回復遺伝子 *Rf98* と CMS 遺伝子の実体を明らかにすることを目的として分子遺伝学的解析を行った．

第 1 章では，これまでの CMS に関する分子遺伝学的解析の報告をまとめた．CMS は核とミトコンドリア双方からのアプローチによりその相互作用が究明されてきた．雄性不稔機構については loss-of-function モデルと gain-of-function モデルが提唱されており，本論文ではさらに pore を形成するタイプと呼吸鎖複合体に結合するタイプに分類した．稔性回復機構ではゲノム制御，転写後制御，翻訳制御，翻訳後制御，代謝制御モデルが提唱されていることを示した．その上で，CMS 遺伝子を同定するためには稔性回復遺伝子を決定しなければならないことを考察した．そのため，本研究では稔性回復遺伝子からのアプローチを行った．

第 2 章では，RT98-CMS に対する稔性回復遺伝子 *Rf98* の同定を行い，*Rf98* は P タイプの PPR タンパク質をコードする *PPR762* であることを明らかにした．P タイプの PPR タンパク質は RNA のプロセッシング，スプライシング，分解，翻訳の制御が行うことがこれまでの PPR タンパク質の研究により明らかになっている．そのため，RT98-CMS の原因遺伝子は転写後制御，翻訳制御のいずれかを受けていると考えられた．また，RT98-CMS の完全な稔性回復には機能未知の稔性回復補助遺伝子が必要であることを見出した．









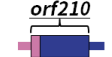

第 3 章では，RT98-CMS の CMS 遺伝子の候補として *orf113* を見出した．*orf113* を含む mRNA の一部は RT98C ではプロセッシングを受けており，第 2 章で見出した *Rf98* の機能のひとつに合致したため，CMS 遺伝子の最有力候補と考えられた．また，他の CMS 遺伝子の候補として *orf276*，*orf210* を見出した．これらの遺伝子は mRNA の蓄積パターンに違いがないため，翻訳制御を受けていることが考えられた．

第 4 章では，第 2 章で得られた組換え個体および *PPR762* を導入した形質転換体について，CMS 遺伝子候補 *orf113* のノーザンブロットを行うことにより相互作用を調査した．その結果，*PPR762* は *orf113* mRNA のプロセッシングには関

与しないことが明らかとなった．そのため，RT98-CMS の稔性回復機構は，PPR762 により，ORF276, ORF210, ORF113 のいずれかが翻訳制御を受けているとするモデルが考えられた．

本研究により RT98-CMS で明らかとなったことを第 1 章のイネにおける報告に追加して表 17 にまとめた．イネの稔性回復遺伝子のクローニングは BT-CMS の *Rf1a* と *Rf1b*, LD-CMS の *Rf2*, CW-CMS の *Rf17*, HL-CMS の *Rf5* と *Rf6*, WA-CMS の *Rf4* に次いで 8 例目である．また，イネにおける CMS 遺伝子の報告は，BT-CMS の *orf79*, LD-CMS の *orf79*, CW-CMS の *orf307*, HL-CMS の *orfH79*, WA-CMS の WA352 に次いで 6 例目である．RT98-CMS は，これまでに報告されていない CMS 遺伝子を持ち，完全な稔性回復には複数の遺伝子が必要であることから，既知の CMS/*Rf* システムとは全く異なる新規システムによって制御されていることを明らかにすることができた．本研究の成果は CMS 多様化に RT98 型 CMS を利用するための育種基盤として利用できると考えられる．

表 17 これまでのイネにおける CMS 研究と本研究の成果

CMS型	表現型	ミトコンドリア CMS遺伝子			核 稔性回復遺伝子 (タンパク質特性)
WA-CMS	 花粉が発達しない	WA352タイプ			Rf4 (PPR protein)
RT102-CMS	 一部の花粉が発達しない 花粉が発芽しない				
HL-CMS	 デンプンが充実しない	orf79タイプ			Rf5 (PPR protein)
BT-CMS	 デンプン充実が不十分				Rf1a (PPR protein) Rf1b (PPR protein)
LD-CMS	 デンプン充実が不十分				Rf2 (Glycine-rich protein)
CW-CMS	 デンプンが糖化しない 花粉が発芽しない	orf307タイプ			Rf17 (機能未知)
RT98-CMS	 デンプンが糖化する 花粉が発芽しない	 orf276 orf224 orf288	 orf210 orf224 CW-orf307	 orf113 nad9 atp4 cox3	Rf98 (PPR protein) +稔性回復補助遺伝子

謝辞

本研究を行うにあたり，多大なるご指導を頂きました鳥山欽哉教授，伊藤幸博准教授，風間智彦助教授に心より感謝申し上げます．特に鳥山欽哉教授には実験計画，イネの育成法，論文の作成法，本博士論文の添削など様々なご指導を頂き，深く御礼申し上げます．風間智彦助教授には実験方法や薬品・器具の取り扱いなどご指導頂き，深く感謝申し上げます．

実験を行う上で機器を使わせていただいた東北大学植物遺伝育種学研究室の西尾剛教授ならびに同研究室の皆様には，この場を借りて御礼申し上げます．

実験方法のご指導，実験データの支援をしてくださった技術補佐員の池田雪子さん，伊藤方子さん，岩井裕子さんには厚く御礼申し上げます．また，研究に対する姿勢や在り方，人生相談など，佐藤雅志先生との議論はかけがえのないものでした．

環境適応生物工学研究室の皆様にはとても充実した研究生活を送らせていただきました．実験や生活の指導をしてくださった先輩方，共に励ましあった同期生，支えてくれた後輩方にはこの場を借りて御礼申し上げます．ありがとうございました．

引用文献

Abad, A. R., Mehrrens, B. J., and Mackenzie, S. A. (1995). Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Plant Cell*, 7, 271-285.

Akagi, H., Sakamoto, M., Shinjyo, C., Shimada, H., and Fujimura, T. (1994). A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Curr. Genet.*, 25, 52-58.

Akagi, H., Nakamura, A., Yokozeki-Misono, Y., Inagaki, A., Takahashi, H., Mori, K., and Fujimura, T. (2004). Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 1449-1457.

Amano, N., Tanaka, T., Numa, H., Sakai, H., and Itoh, T. (2010). Efficient plant gene identification based on interspecies mapping of full-length cDNAs. *DNA Res.*, 17, 271-279.

Bentolila, S., Alfonso, A. A., and Hanson, M. R. (2002). A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 10887-10892.

Bentolila, S., and Stefanov, S. (2012). A reevaluation of rice mitochondrial evolution based on the complete sequence of male-fertile and male-sterile mitochondrial genomes. *Plant Physiol.*, 158, 996-1017.

Bonhomme, S., Budar, F., Lancelin, D., Small, I., Defrance, M. C., and Pelletier, G. (1992). Sequence and transcript analysis of the Nco2 5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. *Mol. Gen. Genet.*, 235, 340-348.

- Brown, G. G. (1999). Unique aspects of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in *Brassica napus*. *J. Hered.*, 90, 351-356.
- Brown, G. G., Formanová, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Zhang, J., Cheung, W. Y., and Landry, B. S. (2003). The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.*, 35, 262-272.
- Cao, L. Y., and Zhan, X. D. (2014). Chinese Experiences in Breeding Three-Line, Two-Line and Super Hybrid Rice. *Yan WG, Bao J S. Rice (N Y): Germplasm, Genetics and Improvement. Rijeka, Croatia: InTech*, 279-308.
- Chase, C. D. (1994). Expression of CMS-unique and flanking mitochondrial DNA sequences in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr. Genet.*, 25, 245-251.
- Chase, C. D. (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial--nuclear interactions. *Trends Genet.*, 23, 81-90.
- Chaumont, F., Bernier, B., Buxant, R., Williams, M. E., Levings, C. S., and Boutry, M. (1995). Targeting the maize *T-urf13* product into tobacco mitochondria confers methomyl sensitivity to mitochondrial respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 1167-1171.
- Cheng, S. H., Zhuang, J. Y., Fan, Y. Y., Du, J. H., and Cao, L. Y. (2007). Progress in research and development on hybrid rice: a super-domesticated in China. *Ann. Bot.*, 100, 959-966.
- Cui, X., Wise, R. P., and Schnable, P. S. (1996). The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science*, 272, 1334.

Delannoy, E., Stanley, W. A., Bond, C. S., and Small, I. D. (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 1643-1647.

Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., Falentin, C., Giancola, S., Renard, M., Budar, F., Small, I., Caboche, M., Delourme, R., and Bendahmane, A. (2003). Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep.*, 4, 588-594.

Dewey, R. E., Levings, C. S., and Timothy, D. H. (1986). Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell*, 44, 439-449.

Dewey, R. E., Timothy, D. H., and Levings, C. S. (1987). A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 5374-5378.

Dewey, R. E., Timothy, D. H., and Levings III, C. S. (1991). Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Curr. Genet.*, 20, 475-482.

Dill, C. L., Wise, R. P., and Schnable, P. S. (1997). Rf8 and Rf* mediate unique T-urf13-transcript accumulation, revealing a conserved motif associated with RNA processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize. *Genetics*, 147, 1367-1379.

Ducos, E., Touzet, P., and Boutry, M. (2001). The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *Plant J.*, 26, 171-180.

Duroc, Y., Gaillard, C., Hiard, S., Defrance, M. C., Pelletier, G., and Budar, F. (2005). Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for Ogura cytoplasmic male sterility in Brassiceae. *Biochimie*, 87, 1089-1100.

Duroc, Y., Gaillard, C., Hiard, S., Tinchant, C., Berthomé, R., Pelletier, G., and Budar, F. (2006). Nuclear expression of a cytoplasmic male sterility gene modifies mitochondrial morphology in yeast and plant cells. *Plant Sci.*, 170, 755-767.

Duroc, Y., Hiard, S., Vrielynck, N., Ragu, S., and Budar, F. (2009). The Ogura sterility-inducing protein forms a large complex without interfering with the oxidative phosphorylation components in rapeseed mitochondria. *Plant Mol. Biol.*, 70, 123-137.

Forde, B. G., and Leaver, C. J. (1980). Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 418-422.

Fujii, S., and Toriyama, K. (2009). Suppressed expression of RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 9513-9518.

Fujii, S., Kazama, T., Yamada, M., and Toriyama, K. (2010). Discovery of global genomic re-organization based on comparison of two newly sequenced rice mitochondrial genomes with cytoplasmic male sterility-related genes. *BMC Genomics*, 11, 209.

Fujii, S., Kazama, T., Ito, Y., Kojima, S., and Toriyama, K. (2014). A candidate factor that interacts with RF2, a restorer of fertility of Lead rice-type cytoplasmic male sterility in rice. *Rice (N Y)*, 7, 1.

Gabay-Laughnan, S., Kuzmin, E. V., Monroe, J., Roark, L., and Newton, K. J. (2009). Characterization of a novel thermosensitive restorer of fertility for cytoplasmic male sterility in maize. *Genetics*, 182, 91-103.

Geddy, R., and Brown, G. G. (2007). Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection. *BMC Genomics*, 8, 1.

Grelon, M., Budar, F., Bonhomme, S., and Pelletier, G. (1994). Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* cybrids. *Mol. Gen. Genet.*, 243, 540-547.

Gulyas, G., Shin, Y., Kim, H., Lee, J. S., and Hirata, Y. (2010). Altered transcript reveals an orf507 sterility-related gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L). *Plant Mol. Biol. Rep.*, 28, 605-612.

Gutierrez, S., Sabar, M., Lelandais, C., Chetrit, P., Diolez, P., Degand, H., Boutry, M., Vedel, F., de Kouchkovsky, Y., De Paepe, R. (1997). Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 3436-3441.

Gutierrez, S., Combettes, B., De Paepe, R., Mirande, M., Lelandais, C., Vedel, F., and Chetrit, P. (1999). In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5' to the first exon of the mitochondrial nad1 gene is associated with lack of the NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit. *Eur. J. Biochem.*, 261, 361-370.

Hanson, M. R., Wilson, R. K., Bentolila, S., Köhler, R. H., and Chen, H. C. (1999).

Mitochondrial gene organization and expression in petunia male fertile and sterile plants. *J. Hered.*, 90, 362-368.

Hedgcoth, C., El-Shehawi, A. M., Wei, P., Clarkson, M., and Tamalis, D. (2002). A chimeric open reading frame associated with cytoplasmic male sterility in alloplasmic wheat with *Triticum timopheevi* mitochondria is present in several *Triticum* and *Aegilops* species, barley, and rye. *Curr. Genet.*, 41, 357-366.

Heng, S., Wei, C., Jing, B., Wan, Z., Wen, J., Yi, B., Ma, C., Tu, J., Fu, T., Shen, J. (2014). Comparative analysis of mitochondrial genomes between the hau cytoplasmic male sterility (CMS) line and its iso-nuclear maintainer line in *Brassica juncea* to reveal the origin of the CMS-associated gene orf288. *BMC Genomics*, 15, 1.

Horn, R., Köhler, R. H., and Zetsche, K. (1991). A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Mol. Biol.*, 17, 29-36.

Horn, R., Hustedt, J. E., Horstmeyer, A., Hahnen, J., Zetsche, K., and Friedt, W. (1996). The CMS-associated 16 kDa protein encoded by *orfH522* in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasms of sunflower. *Plant Mol. Biol.*, 30, 523-538.

Hu, J., Wang, K., Huang, W., Liu, G., Gao, Y., Wang, J., Huang, Q., Ji, Y., Qin, X., Wan, L., Zhu, R., Li, S., Yang, D., and Zhu, Y. (2012). The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *Plant Cell*, 24, 109-122.

Hu, J., Huang, W., Huang, Q., Qin, X., Dan, Z., Yao, G., Zhu, R., Zhu, Y. (2013). The mechanism of ORFH79 suppression with the artificial restorer fertility gene *Mt-GRP162*. *New Phytol.*, 199, 52-58.

Huang, J. Z., Zhi-Guo, E., Zhang, H. L., and Shu, Q. Y. (2014). Workable male sterility systems for hybrid rice: Genetics, biochemistry, molecular biology, and utilization. *Rice (N Y)*, 7, 1-14.

Huang, W., Hu, J., Yu, C., Huang, Q., Wan, L., Wang, L., Qin, X., Ji, Y., Zhu, R., Li, S., Zhu, Y. (2012). Two non-allelic nuclear genes restore fertility in a gametophytic pattern and enhance abiotic stress tolerance in the hybrid rice plant. *Theor. Appl. Genet.*, 124, 799-807.

Huang, W., Yu, C., Hu, J., Wang, L., Dan, Z., Zhou, W., He, C., Zeng, Y., Yao, G., Qi, J., Zhang, Z., Zhu, R., Chen, X., Zhu, Y. (2015). Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 201511748.

Igarashi, K., Kazama, T., and Toriyama, K. (2016). A gene encoding pentatricopeptide repeat protein partially restores fertility in RT98-Type cytoplasmic male-sterile rice. *Plant Cell Physiol.*, 57, 2187-2193.

Itabashi, E., Iwata, N., Fujii, S., Kazama, T., and Toriyama, K. (2011). The fertility restorer gene, *Rf2*, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. *Plant J.*, 65, 359-367.

Itabashi, E., Kazama, T., and Toriyama, K. (2009). Characterization of cytoplasmic male sterility of rice with Lead Rice cytoplasm in comparison with that with Chinsurah Boro II cytoplasm. *Plant Cell Rep.*, 28, 233-239.

Iwabuchi, M., Kyojuka, J., and Shimamoto, K. O. (1993). Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J.*, 12, 1437.

- Iwabuchi, M., Koizuka, N., Fujimoto, H., Sakai, T., and Imamura, J. (1999). Identification and expression of the kosen radish (*Raphanus sativus* cv Kosen) homologue of the ogura radish CMS-associated gene, *orf138*. *Plant Mol. Biol.*, 39, 183-188.
- Janska, H., Sarria, R., Woloszynska, M., Arrieta-Montiel, M., and Mackenzie, S. A. (1998). Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell*, 10, 1163-1180.
- Ji, J., Huang, W., Yin, C., and Gong, Z. (2013). Mitochondrial cytochrome c oxidase and F1Fo-ATPase dysfunction in peppers (*Capsicum annuum* L) with cytoplasmic male sterility and its association with *orf507* and *Ψatp6-2* genes. *Int J Mol Sci*, 14, 1050-1068.
- Jing, B., Heng, S., Tong, D., Wan, Z., Fu, T., Tu, J., Ma, C., Yi, B., Wen, J., Shen, J. (2011). A male sterility-associated cytotoxic protein ORF288 in *Brassica juncea* causes aborted pollen development. *J. Exp. Bot.*, err355.
- Johns, C., Lu, M., Lyznik, A., and Mackenzie, S. (1992). A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants. *Plant Cell*, 4, 435-449.
- Jordan, D. R., Mace, E. S., Henzell, R. G., Klein, P. E., and Klein, R. R. (2010). Molecular mapping and candidate gene identification of the *Rf2* gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench]. *Theor. Appl. Genet.*, 120, 1279-1287.
- Karpenahalli, M. R., Lupas, A. N., and Söding, J. (2007). TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR-and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics*, 8, 2.

Kazama, T., and Toriyama, K. (2003). A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett.*, 544, 99-102.

Kazama, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Sugita, M., and Toriyama, K. (2008). Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant J.*, 55, 619-628.

Kazama, T., and Toriyama, K. (2014). A fertility restorer gene, Rf4, widely used for hybrid rice breeding encodes a pentatricopeptide repeat protein. *Rice (N Y)*, 7, 28.

Kazama, T., Itabashi, E., Fujii, S., Nakamura, T., and Toriyama, K. (2016). Mitochondrial ORF79 levels determine pollen abortion in cytoplasmic male sterile rice. *Plant J.*, 85, 707-716.

Kim, D. H., Kang, J. G., and Kim, B. D. (2007). Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated *orf456* gene of chili pepper (*Capsicum annuum* L). *Plant Mol. Biol.*, 63, 519-532.

Kim, D. H., and Kim, B. D. (2006). The organization of mitochondrial *atp6* gene region in male fertile and CMS lines of pepper (*Capsicum annuum* L). *Curr. Genet.*, 49, 59-67.

Kitazaki, K., Arakawa, T., Matsunaga, M., Yui - Kurino, R., Matsuhira, H., Mikami, T., and Kubo, T. (2015). Post-translational mechanisms are associated with fertility restoration of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant J.*, 83, 290-299.

Klein, R. R., Klein, P. E., Mullet, J. E., Minx, P., Rooney, W. L., and Schertz, K. F.

(2005). Fertility restorer locus *Rfl* of sorghum (*Sorghum bicolor* L) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theor. Appl. Genet.*, 111, 994-1012.

Köhler, R. H., Horn, R., Lössl, A., and Zetsche, K. (1991). Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 227, 369-376.

Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, H., Hayakawa, T., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., Sakai, T., Kawasaki, S., and Imamura, J. (2003). Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J.*, 34, 407-415.

Kojima, H., Kazama, T., Fujii, S., and Toriyama, K. (2010). Cytoplasmic male sterility-associated ORF79 is toxic to plant regeneration when expressed with mitochondrial targeting sequence of ATPase γ subunit. *Plant Biotech.*, 27, 111-114.

Komori, T., Ohta, S., Murai, N., Takakura, Y., Kuraya, Y., Suzuki, S., Hiei, Y., Imaseki, H., and Nitta, N. (2004). Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L). *Plant J.*, 37, 315-325.

Korth, K. L., Kaspi, C. I., Siedow, J. N., and Levings, C. S. (1991). URF13, a maize mitochondrial pore-forming protein, is oligomeric and has a mixed orientation in *Escherichia coli* plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 10865-10869.

Krishnasamy, S., and Makaroff, C. A. (1993). Characterization of the radish mitochondrial *orfB* locus: possible relationship with male sterility in Ogura radish. *Curr. Genet.*, 24, 156-163.

Krishnasamy, S., and Makaroff, C. A. (1994). Organ-specific reduction in the

abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. *Plant Mol. Biol.*, 26, 935-946.

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, 305, 567-580.

Kuroda, M., Kimizu, M., and Mikami, C. (2010). A simple set of plasmids for the production of transgenic plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2348-2351.

Landgren, M., Zetterstrand, M., Sundberg, E., and Glimelius, K. (1996). Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol. Biol.*, 32, 879-890.

Laver, H. K., Reynolds, S. J., Moneger, F., and Leaver, C. J. (1991). Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J.*, 1, 185-193.

Lelandais, C., Albert, B., Gutierrez, S., De Paepe, R., Godelle, B., Vedel, F., and Chétrit, P. (1998). Organization and expression of the mitochondrial genome in the *Nicotiana glauca* CMSII mutant. *Genetics*, 150, 873-882.

Levings III and Charles S. (1990). The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. *Science*, 250, 942-947.

L'Homme, Y., Stahl, R. J., Li, X. Q., Hameed, A., and Brown, G. G. (1997). *Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the *pol* CMS-associated *orf224* gene. *Curr. Genet.*, 31, 325-335.

Li, J., Pandeya, D., Jo, Y. D., Liu, W. Y., and Kang, B. C. (2013). Reduced activity of ATP synthase in mitochondria causes cytoplasmic male sterility in chili pepper. *Planta*, 237, 1097-1109.

Liu, F., Cui, X., Horner, H. T., Weiner, H., and Schnable, P. S. (2001). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell*, 13, 1063-1078.

Logan, D. C. (2006). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.*, 57, 1225-1243.

Luo, D., Xu, H., Liu, Z., Guo, J., Li, H., Chen, L., Fang, C., Zhang, Q., Bai, M., Yao, N., Wu, H., Wu, H., Ji, C., Zheng, H., Chen, Y., Ye, S., Li, X., Zhao, X., Li, R., and Liu, Y. G. (2013). A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nat. Genet.*, 45, 573-577.

Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M. L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J. P., Szurek, B., Taconnat, L., Small, I. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, 16, 2089-2103.

Mackenzie, S. A., and Chase, C. D. (1990). Fertility restoration is associated with loss of a portion of the mitochondrial genome in cytoplasmic male-sterile common bean. *Plant Cell*, 2, 905-912.

Mackenzie, S., He, S., and Lyznik, A. (1994). The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol.*, 105, 775.

Mackenzie, S., and McIntosh, L. (1999). Higher plant mitochondria. *Plant Cell*, 11,

571-585.

Manna, S. (2015). An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie*, 113, 93-99.

Matera, J. T., Monroe, J., Smelser, W., Gabay-Laughnan, S., and Newton, K. J. (2011). Unique changes in mitochondrial genomes associated with reversions of S-type cytoplasmic male sterility in maize. *PloS One*, 6, e23405.

Matsuhira, H., Kagami, H., Kurata, M., Kitazaki, K., Matsunaga, M., Hamaguchi, Y., Hagihara, E., Ueda, M., Harada, M., Muramatsu, A., Yui-Kurino, R., Taguchi, K., Tamagake, H., Mikami, T., and Kubo, T. (2012). Unusual and typical features of a novel restorer-of-fertility gene of sugar beet (*Beta vulgaris* L). *Genetics*, 192, 1347-1358.

Menassa, R., L'Homme, Y., and Brown, G. G. (1999). Post-transcriptional and developmental regulation of a CMS-associated mitochondrial gene region by a nuclear restorer gene. *Plant J.*, 17, 491-499.

Moneger, F., Smart, C. J., and Leaver, C. J. (1994). Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. *The EMBO J.*, 13, 8.

Motomura, K., Ishimine, Y., Murayama, S., Higa, T., Goya, A., and Tomoyose, T. (2001). Inheritance of cytoplasmic male sterility and restorer fertility gene in a developed rice line, RT98C. *Jpn. J. Trop. Agric.*, 45, 202-208.

Motomura, K. (2002). イネの雄性不稔細胞質をもつ稔性回復遺伝子ヘテロ型個体の種子稔性低下の要因. *Jpn. J. Trop. Agric.*, 46, 23-27.

- Motomura, K., Moromizato, Z., and Adaniya, S. (2003). Inheritance of cytoplasmic male sterility and restoration of fertility in rice line, RT102, derived from *Oryza rufipogon*. *Jpn. J. Trop. Agric.*, 47, 70-76.
- Nakai, S., Noda, D., Kondo, M., and Terachi, T. (1995). High-level expression of a mitochondrial *orf 522* gene from the male-sterile sunflower is lethal to *E coli*. *Jpn. J. Breed.*, 45, 233-236.
- Nakajima, Y., Yamamoto, T., Muranaka, T., and Oeda, K. (2001). A novel *orfB*-related gene of carrot mitochondrial genomes that is associated with homeotic cytoplasmic male sterility (CMS). *Plant Mol. Biol.*, 46, 99-107.
- Nivison, H. T., and Hanson, M. R. (1989). Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in petunia. *Plant Cell*, 1, 1121-1130.
- Nizampatnam, N. R., Doodhi, H., Narasimhan, Y. K., Mulpuri, S., and Viswanathaswamy, D. K. (2009). Expression of sunflower cytoplasmic male sterility-associated open reading frame, *orfH522* induces male sterility in transgenic tobacco plants. *Planta*, 229, 987-1001.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A., Kadowaki, K. (2002). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genomics*, 268, 434-445.
- Okazaki, M., Kazama, T., Murata, H., Motomura, K., and Toriyama, K. (2013). Whole mitochondrial genome sequencing and transcriptional analysis to uncover an RT102-type cytoplasmic male sterility-associated candidate gene derived from *Oryza rufipogon*. *Plant Cell Physiol.*, 54, 1560-1568.

O'Toole, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M., Small, I. (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol. Biol. Evol.*, 25, 1120-1128.

Park, J. Y., Lee, Y. P., Lee, J., Choi, B. S., Kim, S., and Yang, T. J. (2013). Complete mitochondrial genome sequence and identification of a candidate gene responsible for cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L) containing DCGMS cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.*, 126, 1763-1774.

Peng, X., Li, F., Li, S., and Zhu, Y. (2009). Expression of a mitochondrial gene orfH79 from the CMS-HongLian rice inhibits *Saccharomyces cerevisiae* growth and causes excessive ROS accumulation and decrease in ATP. *Biotechnology L.*, 31, 409-414.

Peng, X., Wang, K., Hu, C., Zhu, Y., Wang, T., Yang, J., Tong, J., Li, S., and Zhu, Y. (2010). The mitochondrial gene *orfH79* plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root growth in CMS-Honglian rice. *BMC Plant Biol.*, 10, 1.

Pruitt, K. D., and Hanson, M. R. (1991). Transcription of the Petunia mitochondrial CMS-associated Pcf locus in male sterile and fertility-restored lines. *Mol. Gen. Genet.*, 227, 348-355.

Rathburn, H. B., and Hedgcoth, C. (1991). A chimeric open reading frame in the 5' flanking region of *coxI* mitochondrial DNA from cytoplasmic male-sterile wheat. *Plant Mol. Biol.*, 16, 909-912.

Rhoads, D. M., Levings III, C. S., and Siedow, J. N. (1995). URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of ms-T mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27, 437-445.

- Sabar, M., De Paepe, R., and de Kouchkovsky, Y. (2000). Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.*, 124, 1239-1250.
- Sabar, M., Gagliardi, D., Balk, J., and Leaver, C. J. (2003). ORFB is a subunit of F1 FO-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO Rep.*, 4, 381-386.
- Schmitz-Linneweber, C., and Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.*, 13, 663-670.
- Shih-Cheng, L., and Loung Ping, Y. U. A. N. (1980). Hybrid rice breeding in China. *Innovative approaches to rice breeding: Selected papers from the 1979 International Rice (N Y) Research Conference. International Rice (N Y) Research Institute, Los Banos, Philippines*, 35-51.
- Shinada, T., Kikuchi, Y., Fujimoto, R., and Kishitani, S. (2006). An alloplasmic male-sterile line of *Brassica oleracea* harboring the mitochondria from *Diplomatix muralis* expresses a novel chimeric open reading frame, *orf72*. *Plant Cell Physiol.*, 47, 549-553.
- Singh, M., and Brown, G. G. (1991). Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell*, 3, 1349-1362.
- Singh, S. K., Bhati, P. K., Sharma, A., and Sahu, V. (2015). Super hybrid rice in China and India: current status and future prospects. *Int. J. Agric. and Biol.*, 17, 221-232.

Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 4, 1581-1590.

Song, J., and Hedgcoth, C. (1994). A chimeric gene (orf256) is expressed as protein only in cytoplasmic male-sterile lines of wheat. *Plant Mol. Biol.*, 26, 535-539.

Tanaka, N., Fujita, M., Handa, H., Murayama, S., Uemura, M., Kawamura, Y., Mitsui, T., Mikami, S., Tozawa, Y., Yoshinaga, T., Komatsu, S. (2004). Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments. *Mol. Genet. Genomics*, 271, 566-576.

Tang, H. V., Pring, D. R., Shaw, L. C., Salazar, R. A., Muza, F. R., Yan, B., and Schertz, K. F. (1996). Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. *Plant J.*, 10, 123-133.

Tang, H. V., Chen, W., and Pring, D. R. (1999). Mitochondrial *orf107* transcription, editing, and nucleolytic cleavage conferred by the gene *Rf3* are expressed in sorghum pollen. *Sex. Plant Reprod.*, 12, 53-59.

Tang, H., Luo, D., Zhou, D., Zhang, Q., Tian, D., Zheng, X., Chen, L., and Liu, Y. G. (2014). The rice restorer *Rf4* for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of WA352 transcripts. *Mol Plant*, 7, 1497-1500.

Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S., and Tanaka, H. (2006). Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.*, 47, 969-976.

Uyttewaal, M., Arnal, N., Quadrado, M., Martin-Canadell, A., Vrielynck, N., Hiard,

S., Gherbi, H., Bendahmane, A., Budar, F., Mireau, H. (2008). Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility. *Plant Cell*, 20, 3331-3345.

Wang, K., Gao, F., Ji, Y., Liu, Y., Dan, Z., Yang, P., Zhu, Y., Li, S. (2013). ORFH79 impairs mitochondrial function via interaction with a subunit of electron transport chain complex III in Honglian cytoplasmic male sterile rice. *New Phytol.*, 198, 408-418.

Wang, Z., Zou, Y., Li, X., Zhang, Q., Chen, L., Wu, H., Su, D., Chen, Y., Guo, J., Luo, D., Long, Y., Zhong, Y., Liu, Y. G. (2006). Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell*, 18, 676-687.

Wen, L. Y., and Chase, C. D. (1999). Mitochondrial gene expression in developing male gametophytes of male-fertile and S male-sterile maize. *Sex. Plant Reprod.*, 11, 323-330.

Wise, R. P., Gobelman-Werner, K., Pei, D., Dill, C. L., and Schnable, P. S. (1999). Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. *J. Hered.*, 90, 380-385.

Xiao, H., Zhang, F., and Zheng, Y. (2006). The 5' stem-loop and its role in mRNA stability in maize S cytoplasmic male sterility. *Plant J.*, 47, 864-872.

Yamamoto, M. P., Kubo, T., and Mikami, T. (2005). The 5' -leader sequence of sugar beet mitochondrial atp6 encodes a novel polypeptide that is characteristic of Owen cytoplasmic male sterility. *Mol. Genet. Genomics*, 273, 342-349.

Yamamoto, M. P., Shinada, H., Onodera, Y., Komaki, C., Mikami, T., and Kubo, T.

(2008). A male sterility-associated mitochondrial protein in wild beets causes pollen disruption in transgenic plants. *Plant J.*, 54, 1027-1036.

Yang, J., Liu, X., Yang, X., and Zhang, M. (2010). Mitochondrially-targeted expression of a cytoplasmic male sterility-associated orf220 gene causes male sterility in *Brassica juncea*. *BMC Plant Biol.*, 10, 231.

Yi, P., Wang, L., Sun, Q., and Zhu, Y. (2002). Discovery of mitochondrial chimeric-gene associated with cytoplasmic male sterility of HL-rice. *Chinese Science Bulletin*, 47, 744-747.

Yokoi, S., Tsuchiya, T., Toriyama, K., and Hinata, K. (1997). Tapetum-specific expression of the *Osg6B* promoter- β -glucuronidase gene in transgenic rice. *Plant Cell Rep.*, 16, 363-367.

Yu, X., Lu, H., Lu, G., Chen, Z., Cao, J., and Hirata, Y. (2010). Analysis of genetic diversity in cytoplasmic male sterility, and association of mitochondrial genes with petaloid-type cytoplasmic male sterility in tuber mustard (*Brassica juncea* var *tumida* Tsen et Lee). *Mol. Biol. Rep.*, 37, 1059-1067.

Zabala, G., Gabay-Laughnan, S., and Laughnan, J. R. (1997). The nuclear gene *Rf3* affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence *R* implicated in S-type male sterility in maize. *Genetics*, 147, 847-860.

Zhang, D., and Wilson, Z. A. (2009). Stamen specification and anther development in rice. *Chinese Science Bulletin*, 54, 2342-2353.

Zhu, Y., Saraike, T., Yamamoto, Y., Hagita, H., Takumi, S., and Murai, K. (2008). *orf260cra*, a novel mitochondrial gene, is associated with the homeotic transformation of stamens into pistil-like structures (pistillody) in alloplasmic wheat.

Plant Cell Physiol., 49, 1723-1733.

補足資料

補足資料 1 *Rf98* マッピングに使用したプライマー

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSR1001	TTGACAAGCCACACACACAG	GTCCTCCCTTG GTTCTTTCC
SSR1002	AAAGTTGGTATAGGTGTCAC	GATTATGGTATGTTGCTACA
SSR1003	GTCTTGCTGCACCCTCTTTC	CACCACTGCACACAATCCAC
SSR1004	CGGTGTAGATTGTAGGTACA	GTAGTTTAGTTATTGCGCAC
SSR1005	ATCTCGTCCATCTCCGGC	TCCAACGGTCAAGATTAGCC
SSR1006	GTATCCGCTCCGTTTTTCATC	GAGGGGGGGGTGTAGAATAG
SSR1007	TACTCAATTTGAACCATGGA	GATTGTGGGTACATGTGAAC
SSR1008	CCCGTTAAAAGGGAAACTCC	CGAACTCCTAGACTCCACCG
SSR1009	GGCTCAATTCGTAGGTGCC	TTCTCCGGTTAACGTGGAAG
SSR1010	TTTGTAGGATGACACGTGGC	CGGGATTTTCAGTACCTCACG
SSR1011	TGTTGGAGAACTGCTTGGTG	GGAGCGTCTACTGGCTGATC
SSR1012	TAACACAACAATAGCGTCAG	TAGGAAGAACTGAAGAAGCA
SSR1013	AATCCGATAGGAGTACCGCC	AAGTGTATGGGCTGGAATGG
SSR1014	TGATTACACCATTATATTTGTT	GAAAAGCTAAAAGTTAGTGG
SSR1015	AGAAAAGTTAATTCCAAAGG	CAAGGAATTCTAGAGGAGTG
SSR1016	AGCATCCAACGAGGTACAAG	GGAGTGCTAGGGATGTGCAC
SSR1017	GATCAATATGATTTTTTTTCA	TAGTCGATTACTATTGGGTA
SSR1018	GTGAGAGTTCGTAGAAAGTGCC	GGATAAGCAAGATCCGTGAC
SSR1019	CGTCTTCTCTGCAACATTAC	CGAACGCGTTTAGACTAATA
SSR1020	ACAGGTTTGCAGATTACATA	CCCATCTTTAATACCTTCAA
SSR1021	GGAAGAGGACAATCGACAG	GACTATCTTGAAAATTCCCATC
SSR1022	CTCTCAAAGAACTAGGACTC	GAGAAGGTATGATAACCAAT
SSR1023	GTTGAAAGTGTCGAAGCTCT	AATTTGTCACGACCCAAATA
SSR1024	AATTAGAACCATCTGAATTG	GTATTTAAGGTCACGTATCG
SSR1025	TGAACATGCCGAGGAAGC	ATATAGAACCCAAAGCCCCC
SSR1026	TCGTAAGAACATGGAGAACC	GGATTTTCTGATAGCGGTAA

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSR1027	GCACATGGTGAGACGTCCTC	AAGTCCTGTAGTAGGTCACACCG
SSR1028	TCACGAAGGTGAGACTGACG	CCCATGAATCACCACCACC
SSR1029	CCTTGATTGCAGCATCCG	TTGAGCCTTTTACGAGACGG
SSR1030	TGGAActCAACGGGAGTCTC	GAAGTAGTGGAATCGGCGAG
SSR1031	CAGCCCATCTCTCTCCTCTG	GATAGCAGGAAGAGGCGTTG
SSR1032	GATTTTCTTAAATCAAACCT	CGAACATTGAATATATTTTG
SSR1033	CTACACGCGCAAActCTGTC	ATGAAGGTCTAGGCTGCACC
SSR1034	CTTGCAActTGCAACGTCC	GCATAGCAAGAGGCCAAGAG
SSR1035	GACGCTGATGGAGGAGGAC	CATACACGTGGTTGCTCACC
SSR1036	TGATGTGATCTCCTCCTGGC	AGAGCTGCAGAGGAGACAGC
SSR1037	GCCGTCTACCTCATGGTCAC	CCATAACCGTGGTGTTTGAG
SSR1038	TCGACTTGAAGCATCACACC	TCTGAAATGTCAAGTGGGCC
SSR1039	GGGGCCAGAGTTTTCTTCAG	GTACGCGCAGAAAATGAGAG
SSR1040	AATAAATAAAAATCCAGCAC	AGATCAGATATGGCATTAAAG
SSR1041	AATCGAATCTGGATATCTTG	CTTCTACCTAGCTACCGAGA
SSR1042	AATGTTTATCCAACTCATGT	ATTTAGAAACGAGTGTTGTG
SSR1043	CTCGACGGAGCTCTCTTCAC	CAAGAAGCAGAGGAAAAGCG
SSR1044	GGAGATGCTATAGCAGCAGTG	ATTGCTCCTTACCACCTTGC
SSR1045	AGCTCAActCGACAActCCC	CCATCTCCTCTTTCACCTCG
SSR1046	CCGCCATCTCTCTTCAGTTC	CAGTGCATAGAGGAGAGGACG
SSR1047	GAAGTCCTTGCGTGGCAC	AAGGCGACCTTCAGCCTC
SSR1048	CATTGGGGGTGGATAAAGAG	TATCCTCTACTCCCTCGGCC
SSR1049	TCCTCTACCAGTACCGCACC	GCTGGATCACAGATCATTGC
SSR1050	ATCATCTCGCCGTACTCCTC	GGAGTCGTGTCGATGTGG
SSR1051	TAAGATCGTAAGATCGCGGC	AGGCAGGAAGAGGTGGAGG
SSR1052	GCTCGGAATCAATCCAC	CTGGATCCTGGACAGACGAG
SSR1053	GCGCCTTTAGATGCTACTTG	CAGCTCCATCGTAAGCAAAG

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSR1054	TGTTCTCAACACAAAATTCTCT	ATCGTAAGCAAAGTGCATAA
SSR1055	ACCCCGATGATCGATTGTAC	CCCTATTCCCGTGTAATCG
SSR1056	TAAGTACTTGAAAAGGATGA	AGCAGACATAATCTAGATCA
SSR1057	CCTCTCTCTCTCTCTCCCC	TGTTATTGGCACGTGGTGTG
SSR1058	GTAACGCTGCTTGAATTGCC	GTCCATAATCCCCTCTTGAC
SSR1059	ATGGGTACTAACAAAGTTCA	CTTCTTCGTCATATTCTTTC
SSR1060	CTGGATGAAAGGATACAACA	CACATTATCTGTCAAGGTCC
SSR1061	TCCGTATCCTAGTCGCGATC	CGCCGTCATGACTCATACTC
SSR1062	CTCTCTCTCCCCACCCAATC	GAGGGAGGAGGAGGTGTAGG
SSR1063	AAGAATTGGTCAATAAGAGTGG	TTCTCTCTACCGGAGGATG
SSR1064	GGAACTAAACATGGTGCAAG	ACCAGATCACATGAAGAGGA
SSR1065	ATTTCCACACATCTCGCTG	GTGTCGCCGGTCAAGAAC
SSR1066	CACACACCTCACCTATCCCC	TCCTCCTCCTCCTCCTCCTC
SSR1067	ATGGCGTATTAGCAAAATAA	GATTGTCGTTTAAGTCGCTA
SSR1068	CATCGCATCGTATCGTATCG	GCTTCAAACACGCCTTCTTC
SSR1069	GAGAGAACCTGGTGGTGGAG	AGTGGTAGAAGATCCGAGATCG
SSRH1070	TCCACCAGTTGCAACACACG	TGATCGGACTCCTAACTGCA
SSRH1071	GCATTAGATACCATGTGCCC	AACTTGGTATGTAGGCGGCA
SSRH1072	GTATAGCTGCCTCGAAAGGT	CCCGGGCACCATTATTGAAA
SSRH1073	CACTCGATAGCATTTTTCTCCC	CCGGAGTACGTATGTATAGG
SSRH1074	GTAATCTCTCTCGGTGCATG	GCATACCACACAGGGCAATA
SSRH1075	GGTCTGCTGCCCTTTCATTA	AGTTTCAGCTAGCTGGCTCC
SSRH1076	GATTTTCAGCGAGGCGGATGA	GCCACTGGGAATGATACAGA
SSRH1077	CCATAAAGCTAAGCAAGGTG	TGCGTAGACAGTTTAAGGCT
SSRH1078	GCGCATGTCTCCATCAACAT	GGCAAGCTTTGGTACAAGCA
SSRH1079	GGCATGCATCAGGATCGATC	AAACCGGTCCATGTGGCAGT
SSRH1080	TACTCGAATCGAATCACTGC	ACGCACACACACACTCACAT

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSRH1081	GAGAAACATGGGACAGAAGC	AAGGAGTGGAGGGACCTGAA
SSRH1082	CAGCCTTATTACCGACCAAG	CTCTGCCCTCTGAAATCAATC
SSRH1083	CTCCGCCTCATCGAATCTTT	CAAGAATGTGGTGTTCACCTGTG
SSRH1084	GTCGTTTAAGTCGCTAAGAAC	GATGGGAGCCTAACACACAT
SSRH1085	TTGCAATTTGGGCTAGTGGC	GCCAGCTCTTGGACGTGATT
SSRH1086	CTTTGTGCGCTATGGTATC	TTAGTTGACACAGTGCTCGG
SSR10070	TTAACTCCTCTGCTCTGCACAACC	GCGTGTGTGTCTTCTGTGTAATCG
SSR10071	AACTCTGTCCATGCATGCTACTCC	TTGCAGACCGATGAACTGATACG
SSR10072	CCTGCAGTACTCGCGGAAGAGG	GGACGAACACCAGTAGGATCTCACG
SSR10073	CTCCCTGGCCTTTAAAGCTGTGC	GACGAACAGCAGCAGAAGAGAAGC
SSR10074	CTCGTACTACCGATTTCCACACC	GCCTCTTAATCAGCTCGTACTCC
SSR10075	CATGGCAGTGAGAGGATGATAGC	CAGGAGCCAATGTTTCAAATCG
SSR10076	TAAGAGGGAACAGAACGGTAAAGACG	TTCGATGAGTTCTTCACCCTTTCC
SSR10077	AGTGCGCCAGACTCTTGGAGTGG	CATTTGCGGCCCAATCATTTCC
SSR10078	GATCACCTGCCATCATACTAAACC	ATAGAGAGCAAACGGTCAATGG
SSR10079	TTCAAGCATGGACCTCAGATTAGC	AAAGACGTTGGGCAAGAAAGACG
SSR10080	GTACAGGCACGAGCAGAGGAAGG	CGTGCAATCCTTGTCGTCATCG
SSR10081	ATGCTCTCAAGTGTGTCAAGG	AACCTCTGGAGTATGTGTAGTGC
SSR10082	GGTCAAGGCTCAGCCATACTTGG	AAGTTGAAGGACGGGTACAATGTCTG
SSR10083	GTTTGCGCCTCTGTTCTTGC	TTCCCTCGAGTTACCAAACAAGC
SSR10084	CGGCAAGAAGGTGAGCAGTGG	CGTTCTCATGGCGGAGCTTGC
SSR10085	GGCCTGGAGCTAGATAGAGTTGG	CGTCAACTGCAAAGTCCAAAGG
SSR10086	CAACAACATCTGTGAGGGTTTCG	CACCACCATCTCCTCTTTCACC
SSR10087	GCACGTAAATGATAGGCACCATTGC	CACAAGGTGGTGTGGGCTAGACG
SSR10088	AAACGGTGGTCTCATCATTTCTGC	TCCCATCAGTCGTCAGATATTGC
SSR10089	GAGATCCCAGTTCTCCGAGTAGC	GCAAAGAATAGTTTGCCACTGC
SSR10090	CGGGTAAGGGTGGTGACACG	CGGAATATTAGTAGCGTCGTTTCG

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSR10091	ACTAAACCCAGCAAAGCCAAACG	GGCTTAGGCCCACAGTTCTTGC
SSR10092	ATCCGTGACGTACCATGAGAAGG	GGAGGAAGAAGAAGGAGAGTGTTG
SSR10093	CCGTCCCTACGACAGGTAGTATAGC	GTAGTAGCTACCCGCCGATCACC
SSR10094	CAGGAGTCGTCGTCGATGTGG	AAGGAGGGTTCTTTGGTGTACCG
SSR10095	TCTACCCAATCCACCCATCC	AACAGGATGAGAAGAGAGATCAGC
SSR10096	ACGATCAGACGCCTAACTACAGC	CCCTCCTGCTAACTTGAGACG
SSR10097	CAGCGGTTTCCGTACAACCTACC	TCGTGTACGACGACGACTTCC
SSR10098	CCAGCTGTTAATTAGCATGTGTGAGC	CAGCAAAGGCGTACGTATCTCG
SSR10099	GATCTCTCCGGGAGGAAGAGTGC	CTCCTCGTCTCGTCTCGTCTCG
SSR10100	CCATGAGCTCCCACTGGTTCC	CTCTGTCGTGTAGTTCTGGGTGTGG
SSR10101	CACACTGGATCCTGGACAGACG	CAGCACACACCTCCGTGAAGC
SSR10102	CCAGAAGACACCTCATCGATCAACC	CGGTGCTGGCTATGATGTGTGG
SSR10103	CGACACCGATCAAATTAACCTACG	CGTACGCCTCCTACATCAACAGC
SSR10104	TGGGTATTTATAGACAGGAGGTGTG	ACCCAGACATCACCCTAACATCG
SSR10105	GCTCGGGCTGCTATTATTGATGC	GCCAACTCAAGAACAAAGCTGAATGG
SSR10106	GGTGGTAGATTTGCGCGTACTGG	CGCGGAGCAAAGCAGAGAGG
SSR10107	AAGTGGGATGCATACGGTTTAGGG	CTCGCGATCTAGACTCCCATCG
SSR10108	GGAGAGAAACATGGCAACACTGC	GCCAAGAACGTCAGTACTCTCTCG
SSR10109	GGTAGGTAATACCAGGAGGGAGTGG	AAACCACGCACACTTCCTTTCC
SSR10110	TATCGGATCTCTAACTCGTTGC	AATACACCAGTCTCTCACTCTCACC
SSR10111	GCACGCTTCTAATTAAGCCTAACG	TGTTACTACTGAGTGCATGGTGAGG
SSR10112	GAAGCATACACTCCCTCCTTCC	CTATCTAACTGATACTCCCTCCATCC
SSR10113	CGGCCTTATCCCTATATGAGTCAACC	CACGCGGATAAGTGAGAGAGC
SSR10114	GAGTCTCTCAGCCACGGAGTCG	GGAGGAAGACGAGGAAGAAGACG
SSR10115	GACCAGATGGAGTAATCACTAGC	ACCTGTAGTCTAGTCACACAGTTGC
SSR10116	AATCTTCCTCGAGCCAATGATGC	CAGACACAACACAATTCCATGTGC
SSR10117	CCTCCTAACCACTGCCTAATGC	GCCTCCACCTTTCTCTCTCATCC

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSR10118	CCACTACAAGGTGATGACAC	GATGCGTCGAAAGAGAGT
SSR10119	CCACTAGTTTCGATATGTAGC	CCGCAGAAGTTCAGATTGCA
SSR10120	CATCCCTCAACCACAAAACC	GATTTCAGCTATGGCTCTGT
SSR10121	CGATGATCTGTCATCCTGTA	TCTAGAATCGGCTCAAGCCA
SSR10122	AGTAGATCAGGGTGGTGTTC	GTGGGTTCTTTTGATCCTTC
SSRH10001	CACTACAACGAGGCCTGGAG	CGTCAACTGCAAAGTCCAAA
SSRH10002	GGCTTCTGCTTCTTTTGACG	GCATAGTTGAATATGTCAGCACAA
SSRH10003	TGGAACATCTTGGAAGCACA	TTTGTAGCCTGCTGTTGCTG
SSRH10004	CAACTCCCCCGAGAAGAAT	CCACCATCTCCTCTTTTACC
SSRH10005	CCCGACGAGGTGAAAGAG	CTCCTTGGTCCGCAGGTAT
SSRH10006	CTGCCAAGATTGGAGAGGA	CACCTCACCTCACCTCACCT
SSRH10007	GGAGGAAGAGGAGGAGGAGA	CCCGACGCCTAGAGAGAGA
SSRH10008	CTCGGCCCCAAAATAAGTT	TGGGGGTGGATAAAGAGAGA
SSRH10009	AGCGAGAGAGGGAGAGATGA	CCTTGATCCCCACGTCCT
SSRH10010	CTCACCGTCACCGTCGTG	GTCGAGCAGGGTGGACTTG
SSRH10011	CTGGTGATTGCCGACCTC	GTAGAGGGCGATGGGGAAC
SSRH10012	TCGAAAGTCCTCACAAAGAGAA	GGAGACGGATTTACCGGTTT
SSRH10013	TGACAACAACTTTTTTGGGGTA	TTCAAGTTCATATGCATGATTCTACA
SSRH10014	GGAGGAATCGGAGGATGAAT	TCGAATGTATCCCTTCTTAGCC
SSRH10015	GAGCCTCTTGAGCTGCTTCG	TAGTTTTGACAACGTTTGGCTTT
SSRH10016	GAGGAGAGGACGAGGAGAAGA	CTCTCTTCAGTTCCCCAACC
SSRH10017	CATCATGGCCGACTCCAC	GGAGGAGGGGGAGAGAGG
SSRH10018	CAGTCATAGGCTCTTGTTACGC	CATGTTAAGTAACCCGTGCTTG
SSRH10019	CTAGACCGGGCATGTCATCT	GGCTACAGCATCGACCTGA
SSRH10020	ACCATCGAGCTAATCCGTGA	TCTTCCTCTTCCGCTTCGT
SSRH10021	TGCTAGCTAGTTCCTTGTACAATCT	AAGAATATAGGAAGAAAAGGGCATT
SSRH10022	TCCGTTTCAACAACATAAAACTT	CACCCATTGTAACACTTTTTTG

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSRH10023	GGCGAAGTCGAAGTCCAG	GCCTTTTCCAAACCGACTTT
SSRH10024	GCCTCCATCCCCACTTCC	ACCACAGGGGTAGAGCGAAG
SSRH10025	GGGGAAGAAGGAGAGAGGAA	CTCCGGTTTTATCCAACGTG
SSRH10026	GCTCCTTACCACCAACCATT	CTACGCCGAGATCCAGCAG
SSRH10027	GCTCCTTACCACCAACCATT	CTACCAGTACCGCACCAAGG
SSRH10028	CAGGTATCCCATCAGCTCGT	AGGAGGAGGAGGAGAGCAAC
SSRH10029	CAGGTATCCCATCAGCTCGT	AGGAGGAGGAGGAGAGCAAC
SSRH10030	ACCACCATCTCCTCCTTCG	AGGGATGAGATCGAGGGAAT
SSRH10031	ACCACCATCTCCTCCTTCG	CGTGAGTGAAGGGTTTTCGAT
SSRH10032	GGGATGGGGTTGGAGAAG	GAAATGTGGACCCATTGACA
SSRH10033	GGTGGGGGTGGGGACTAC	CTCTCCATCATCTCGCCGTA
SSRH10034	CTCTACCCAATCCACCCATC	GTCCCATAGGGGCTCAC
SSRH10035	GAGGAGGGGGTAGAGAATCG	CCCTCTCGTCTCTCCCTTG
SSRH10036	CTCCTCTGCTACCGGCAAG	GCGCGAGTGGATAAGGTC
SSRH10037	GGATCCTACATGGCGCTAAT	TGTATTTTCCTTTCTTTTCCTTTC
SSRH10038	TTTCCGTTTTCTTCTCATTCTTC	ATATGATGTGGCATAATTTTGACTG
SSRH10039	CCTTTCTCCCGCAAGATT	GAGCAACTCCACCTCCTCAC
SSRH10040	GGCCACCACATGTAAGCAC	TCCATGTGTGAGTGATCTTTTTG
SSRH10041	GTCAGGGACCAGGAGATGG	CAGGATCACCGTCGTCGT
SSRH10042	TTGATTGATCCCCTCTCTCC	GACAGCACCTCCGTCCAC
SSRH10043	CCCGAGGGCTTCTACGTC	CTGCCACCACACACACATC
SSRH10044	ACGAGAACTCCGGCTTCC	GTCGCTGACAATGGTGGAC
SSRH10045	GACCACTTCGTTTCGATTCCCT	ATGCGACAGCCAAACAAAC
SSRH10046	GAGGTGTGCTTCATGCCTTT	TGGTTTTCAACTCTGGAGAAAAA
SSRH10047	GCTTGGAGTTGAGGAAGTCG	CTGCTCGGAGGGATGACC
SSRH10048	GCTTGGAGTTGAGGAAGTCG	CTGCTCGGAGGGATGACC
SSRH10049	CCCTCCCTCTGACTCTCTCC	TCAGGTTGGGTGGGGAAT

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSRH10050	CCCTCCCTCTGACTCTCTCC	TCAGGTTGGGTGGGAAT
SSRH10051	GGTCGCTTCCAGTGACCTAA	CTCCTGCTGCTGATCCTTG
SSRH10052	CCCCCTTATGACCTCTTCCT	CTCCTGCTGCTGATCCTTG
SSRH10053	CCCCCTTATGACCTCTTCCT	CTCCTGCTGCTGATCCTTG
SSRH10054	GGTAAGGACGTGGGAGGAG	CGTGGACCCACATGTCA
SSRH10055	AATCCAATGTCACAGCTGCAAA	AGCTGTGCGGATCACCTCT
SSRH10056	AAGATCTCGCGAGGAGGAG	ATGAACACGAGGGCAGAATC
SSRH10057	CATGGCAGCTGAGTCACG	CCAGACGGAGGAGAGAGAGA
SSRH10058	TCTGCTGTTGAACTTCTTCTTTC	AACACTTCGCTGCATTACTGA
SSRH10059	CATTGCCATGTAGTATTTTCTAGCTT	GTTGAAGCTGGGTCTTGCAT
SSRH10060	ACATCATGCGGACCCACT	GGTTGACTGGGAGAAGGAGA
SSRH10061	TCCATTGGAATTTGATAAGGTAAAA	GCCCTCCACTTCGAGATATG
SSRH10062	TTCAGAAACGTTCTGGCAAGT	CTCGAGCCAGGAAACGAG
SSRH10063	CGAGTTGAAAAGGAGGCTTG	GCCAGTAGGGGTGGAAAAA
SSRH10064	TCCTTGACAAAACCATCAAA	CAAGGAAGGAGATGGATGGA
SSRH10065	GAAGCCAAAACACACAGCAC	GCGAAGGAATGGCGTATG
SSRH10066	GAAGCAGGGGATGCTCAC	CCGTTCCGATCAGCACCT
SSRH10067	CAACATTGTCTGCAAGAACTGC	CATTTGATCCGAAATCTCAGC
SSRH10068	GGGGTTGGATGAGAAGGAG	GAGCACCTTGAACGAGTCCT
SSRH10069	GCACGTGTACATGGCGTACC	CGGAACACCACCCTGATCTA
SSRH10070	GGGGTCCAGCTCGAGTATC	GCAAAACGCAAAACAAGCTC
SSRH10071	ACGCCTCCTCCCTTCGAG	GGAGGGATCCGTTTCGAGAG
SSRH10072	CCGCCCTTCTGGAATCT	GGAGGAGAGATGAGAAGACGA
SSRH10073	AAGCAGAGGAAAACCCCAAG	GACCCACCTCCCTCACC
SSRH10074	TGTGGCTTGTGAATTCTCGT	AAAAAGTGCCTGAGACCTACA
SSRH10075	CGTTTGGCATTACACACAT	CCGAAGGGGAGAGAAAGAGA
SSRH10076	CTAGCTCAGGTCGCTGGTG	TCCTCCCTTCTCTCTTTGTTTC

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSRH10077	CTTGTTGGCCACCACTTCC	CAGTCATCCACATGGAAAGC
SSRH10078	CTCTCCCCTCCCAAAACC	CCTCGTCATCCACGGAGT
SSRH10079	CAGCCTATGGGAGTGAGGAG	CCTGGTGAGAACACCCAAGT
SSRH10080	GACGATCGATCCCCTGGA	ATCTCTCCCGTGCAGCAA
SSRH10081	GGTTGAAAACCCGAGCTGT	CACCGTACGCGTCAAACA
SSRH10082	AGGGAGGGTGGGAGAGTG	GAGATCGTTCACCGTTCACC
SSRH10083	GGGAGGGGTGGGTTCTTTAG	GAATCTGCCTCTTCTGCTCCT
SSRH10084	GATCCAGGCGAAGAGGAAG	GTGCACCTTGCGGATGAC
SSRH10085	CCCACTTTTTTCACGTTTTTC	GTACCCCTCCAGCTTCTCGT
SSRH10086	AGGAGTCGTCGTCGATGTG	ACTCCTCCGCCTCCATGA
SSRH10087	ACGAATTTCCAGCAACAAC	AGTCCACGTAAAATAAAATAAGTCAAT
SSRH10088	TTCCCCACATTTAATATTCTTGC	GACGTGCTCACCCCTCTGC
SSRH10089	CGACCAACATACACCCAAAA	TTTCCCCTCAACGGGATATT
SSRH10090	TGTTGCTGTCCCTACTTCC	CGCGCACATTTTTTCAAATTA
SSRH10091	TTGAGACGATCAGACGCCTA	ATCCAAACAAGTTCCCACAA
SSRH10092	GGATCAAGTATTGTACTCGCACAC	AAATCTAAAGAAGTTTAACCCAAAAA
SSRH10093	ACTCCCTTGTCCTTTCGTTC	TCCAATACTCCCTCCGTTTT
SSRH10094	AATTTGCGCGCATGTAAATC	TCATTTTTGGTTAGCACGTTTTT
SSRH10095	CCAAAACACAACCTTTGATTTCTTA	CGTAAAGGAGATCGTTTAGGATAA
SSRH10096	TGTACTCCAACCGTCCGTCT	CGTGACAATGTTTGA CTGTCC
SSRH10097	TTCTCTATTAGCCACTCGTTTT	CTGCGTGATTGTTTTTACGG
SSRH10098	TCTGGAATCATCGAAGTGATAGAA	GACTTCGACCTCCTGCTAGTAA
SSRH10099	GGTCCATTATGGCGTGATTA	GCGCACGCTTTTTCAAATTAC
SSRH10100	TTTTTATTTTGTTATGACTTTGGCTTA	GTGGACTTTTGGATATATGTTTTTC
SSRH10101	CTGAATGCAGCTGCTGTAAAT	GTACGTGAGCCCAATGGAAA
SSRH10102	TGGTTGGTTCTTGTGTGTTCC	TCTGATCGTTTTTCACCCCTAA
SSRH10103	TCTATTGTGGGAACCTGTTTGG	AAAAACTCGCCCTCCTGCTA

補足資料 1 続き

Primer No.	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
SSRH10104	GCAACATTTAAGCACACATT	TCAAACCTCTTTAAATTTGGCTACA
SSRH10105	ACAGGAGGAAGAGGGGGATA	TCTCTCAAAGCCACCACTCC
SSRH10106	ACACATGTTTCGCCGAATTT	CAACGTCCATCCTGTTTTGA
SSRH10107	TTTACACGTTTTTCAAACGTTTTTT	TCTTGATGAGAAAAGAACATAACCT
SSRH10108	CATGTTCAAACATTTGATGTGATG	CAGTTTTCGTGGCAACAATG
SSRH10109	CGACCAACATACACCCAAAA	TTTCCCCTCAACGGGATATT
SSRH10110	CCCTACTTCCCAAACCTGAACC	CGCGCACATTTTTTCAAATTA
InDelT001	CGGCATCAGAGCAGATTGTA	GTGAAACATCTCCGTGGCTT
InDelT002	GTTTTCCCAGTCACGACGTT	GCTTGTTACAGATGGCAAA
InDelT003	GAATCTAGATATATATGTGTGC	AAGCATGGCGAACAATTTGCTC
InDelT004	CGCGAAGCTAAAGCGAAAGT	TCAATTAGCCATCTCAACCTCC
InDelT005	TTGTCTTGCTTAGGCTCCGC	AACAGTTTAAAAAACGTGCG

補足資料 2

RT98 型ミトコンドリアのゲノムシーケンス解析に用いたプライマー

Primer name	Primer sequence	Linkage between contigs
20A_98	AGTAACTACGGCATGTTACG	00020-00109
109A_98-2	ACCCTCTGCCTAGCCTCAGC	
20B_98-2	ACTTCCAATTCCAGCTTTTCG	00020-00011
11A_98	TGTTGAGTTAGCCAAGTGAG	
11B_98	TTCGCTGCTGAAAGATCCCG	00011-00012
12A_98	CCATTCCAAGTTTAGGGACC	
17B_98	TCGTTTTGAGCCATGTAATC	00017-00018
18A_98	CGATAGCAGGACTGGGTACG	
90B_98	AATCCGGTGCGGCAGGAACG	00090-00278
278B_98	TATGTGGAATCGTCTTGCGC	
37B_98	TTACTCCCATTACTGACAAG	00037-00038
38A_98	CTGAGTTCTGAACGAATGGG	
23B_98	ATTCCCACGTTCCAGCCTGC	00023-00024
24A_98	AGAGGACAACCTGTTGTTCC	
24B_98	ATGAAAAGATGTCAGCGTCG	00024-00040
40B_98	AGTGCTCCACCGTATCCTCC	
39A_98	CCAGACTGCGCTACACCTCG	00039-00038
38B_98	CGTAGACCCGGTAACCCATC	
278B_98	TATGTGGAATCGTCTTGCGC	00278-00023
23A_98	GCAATCGATCTATCCCTTGG	
24B_98	ATGAAAAGATGTCAGCGTCG	00024-00020
20A_98	AGTAACTACGGCATGTTACG	
20B_98-1	TACTTCCAATTCCAGCTTTC	00020-00028
28A_98-1	AGCTAGTACCGGATTTTTTCC	
28B_98-1	TCAAACCCAACCTGTGGTGG	00028-00029
29A_98	ATTTCTTATTCATTCAGGGC	

補足資料 2 続き

Primer name	Primer sequence	Linkage between contigs
29B_98-1	GCGGGCCTTTTGTAGAGAAC	00029-00244
244B_98	TATTCGGTAATCCGAATCCC	
24B_98	ATGAAAAGATGTCAGCGTCG	00024-00112
112B_98-2	TCGACCGACAGACAAGGAAC	
112A_98	GGTTTGGAACAGATAAGTTC	00112-00194
194A_98	GATGGCCAGTGATCTTTAGC	
194B_98-2	CTCTACAGCGCGAATAAGCC	00194-00111
111B_98	GCTTCTATTATTGAATCAGG	
111A_98	TCGATCGATACACAGTTGAG	00111-00073
73A_98	AGTGTACGGCATCTGCCGTG	
73B_98	CCCATTCCTATGGCCATTCC	00073-00110
110B_98	CTTGTTCACTTATTATGACG	
208B_98-2	CTGCGCTTGGAAGAAGAACT	00208-00109
109B_98-2	CCTGGCTTGAATGAGGAGAG	

補足資料 3 ノーザンブロットおよび RT-PCR に使用したプライマー

Primer name	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
orf340	ATGAGAAATCGATTTAGTCCG	CTAGTTCTGATATAGACCAA
orf276	ATGCTGCGCTTCGAACGTAT	CTAGGAGGCTGAGTTTTGAT
orf210	ATGGAGAACCCACCAGGGCC	TTAGTACTTATTTATTTTCT
orf174	ATGAAAGAATTTCGTTTACTT	TTAGTTTTTTCCTAATTGCG
orf113	GATGGGACGCTCCAGTGTAT	TTTTCCCAACGAAAAACGAA
orf83a	ATGGTGTGGGACGCCCTAGC	TTAAATGAGAAGACTGGATG
atp4	TCAAAGAACTCTCGACGGG	TAGGACTATCAAGCCTTCCC
cox3	TGGGGTTTTAGATCCTTGGG	ACCTCCCCACCAATAAATAG
Probe_1	TTCCAAATTCATGCCCAAGT	GAGAGGCGGAAGTGAAAGAC
Probe_2	GCCACACTGTAGGCAACTAGC	AGCTCTGCTCCCAAAACAAA
Probe_3	TGATGTTTGATGACCAGCGTA	GAAGGAGGCTCTTCTTTGTCTC
Probe_4	GGGAACGAATAAGTGGATTGA	TTCCGAGTTCATGTCTTAGAAGG
Tubulin_a1	TACAACGGTTGGCGTCGCAC	AACTTGCGCACACGGTCCAG

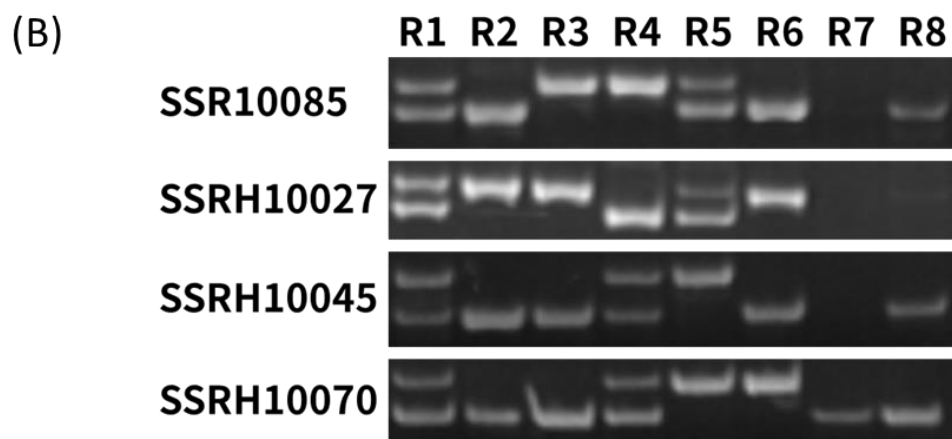
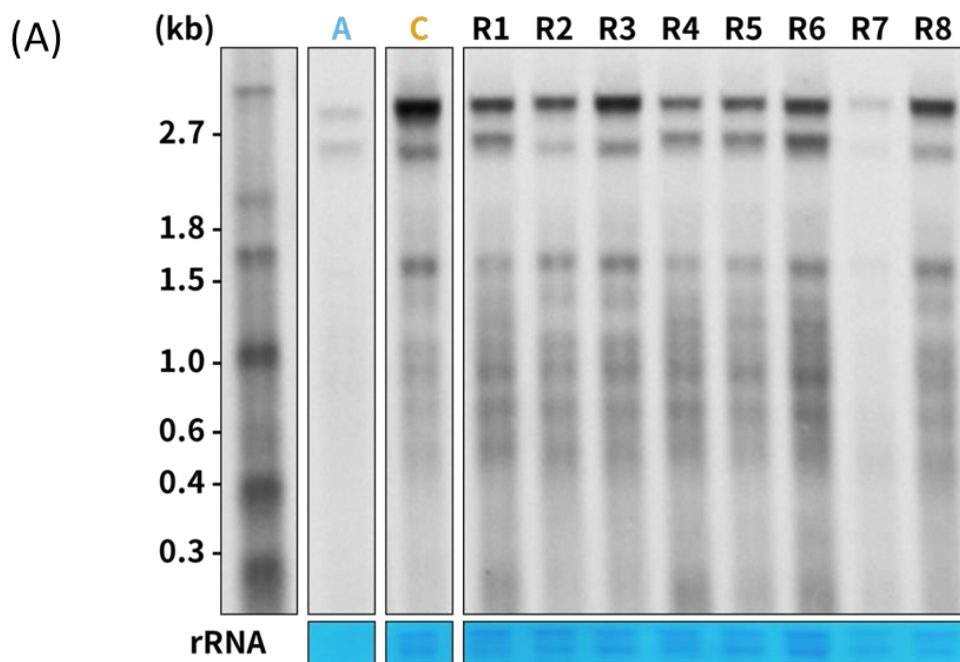
補足資料 4 CR-RT-PCR に使用したプライマー

Primer name	Primer sequence
orf113_RTR1	AGGGACTAGCGTCCCCATAAG
orf113_RTR2	ACAGTGTGGCAACTGCTAAT
orf113_SR1	CGACCAGATCAAGATAGATC
orf113_SR2	CCCTCCGGCAATTGGGCATT
atp4_SF1	TAGAACAAATTCGAGAGGCC
atp4_SF2	TAATTCGGGAAGGCTTGATA
cox3_SF1	TGCATGGTACTGGCATTTTG
cox3_SF2	TAGACGTGGTTCGGTTATTC

補足資料 5

ORF113 リコンビナントタンパク質作製に使用したプライマー

Name	Primer
orf113_BamH1_F1	ATGGATAACCAGTTCATTTTC
orf113_BamH1_F2	GGTCTTAGAGACCATTC CCT
orf113_SacI_R1	TTAAATAATTTCTAGAATGA
orf74_BamH1_F1	GGATCCATGCTCTCTCAAAAGCTTGA



マーカー	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
SSR10085	H	C	T	T	H	C		C
SSRH10027	H	C	C	T	H	C		
SSRH10045	H	C	C	H	T	C		C
SSRH10070	H	C	C	H	T	T	C	C

補足資料 6 組換え個体の *orf113* ノーザンブロット分析予備試験

(A) ノーザンブロット分析, A: RT98A (*rfrf*), C: RT98C (*RfRf*)

(B) 組換え個体のジェノタイピング